

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年9月13日 (13.09.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/66720 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/11, 15/12, 5/00, 21/02, C07K 16/18, 14/47, C12Q 1/68, G01N 33/50, 33/15

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/01863

(22) 国際出願日: 2001年3月9日 (09.03.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-72502 2000年3月10日 (10.03.2000) JP

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 北村俊雄 (KITAMURA, Toshio) [JP/JP]; 〒108-0072 東京都港区白金6-16-20-406 Tokyo (JP). 敦賀弘通 (TSURUGA, Hiromichi) [JP/JP]; 〒142-0051 東京都品川区平塚3-13-13-101 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(74) 代理人: 清水初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MOUSE ADIPOCYTE-ORIGIN GENES

(54) 発明の名称: マウス脂肪細胞由来遺伝子

(57) Abstract: By screening molecules having signal peptides with the use of an originally developed efficient signal sequence trapping method, 8 novel genes likely encoding membranes or soluble proteins are successfully identified. These genes show expression in association with the differentiation of adipocytes.

(57) 要約:

独自に開発した効率的なシグナル配列トラップ法を用い、シグナルペプチドを有する分子のスクリーニングを行なった結果、膜または可溶型蛋白質をコードする可能性がある新規遺伝子を8個を同定することに成功した。これら遺伝子は、脂肪細胞の分化に関連した発現を示した。

Best Available Copy

WO 01/66720 A1

明細書

マウス脂肪細胞由来遺伝子

技術分野

本発明は、脂肪細胞に由来し、シグナル配列を有する新規な蛋白質およびその遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関する。

背景技術

脂肪組織は、その変異がマウスにおける遺伝性の肥満を引き起こす (Zhang, Y. et al. (1994) Nature 372, 425-432) レプチンと呼ばれるサイトカインを産生することが知られるまで、単なる脂肪の貯蔵庫に過ぎないと考えられてきた。現在では、脂肪組織は最大の分泌臓器であると認識されている。

脂肪細胞から産生されるその他の分泌型蛋白質としては、TNF- α やプラスミノーゲン活性化因子阻害剤 (PAI-1) が挙げられる。TNF- α は、脂質やグルコースの代謝に影響を及ぼし、遺伝的に肥満の齧歯類の脂肪組織において過剰発現しており (Hotamisligil, G.S. et al. (1993) Science 259, 87-91)、インスリン抵抗性につながる (Hotamisligil, G.S. et al. (1995) J.Clin. Invest. 95, 2409-2415)。PAI-1は、内臓の脂肪細胞において高度に発現し、内臓肥満における血管疾患の発症に関係している (Shimomura, I. et al. (1996) Nature medicine 2, 800-803)。

現在まで、脂肪細胞から同定されているサイトカインはごくわずかであるが、脂肪組織においては、これら以外にも、脂質やグルコースの代謝を調節する可溶性因子が分泌されていると考えられる。

発明の開示

本発明は、脂肪細胞に由来し、シグナル配列を有する新規な蛋白質、それらの遺伝子、およびそれらと機能的に同等な分子、並びにそれらの製造および用途を提供する。

本発明者等は、上記課題を解決するために、脂肪細胞分化に関してよく特徴付けされたモデルである 3T3-L1 細胞株 (Meuth, M. and Green, H. (1974) Cell 3, 367-374 ; Green, H. and Kehinde, O. (1975) Cell 5, 19-27) から cDNA ライブラリを調製し、レトロウイルス媒介発現クローニングシステム (Kojima, T. and Kitamura, T. (1999) Nature Biotechnol. 17, 487-490) を用いて独自に開発した効率的なシグナル配列トラップ法を用い、シグナルペプチド (von Heijne, (1985) J. Mol. Biol. 184, 99-105) を有する分子のスクリーニングを行なった。SST-REX 法では恒常的活性型サイトカインレセプター MPL との融合蛋白質を発現するライブラリーをスクリーニングすることによって、MPL を細胞表面に発現させることができる蛋白質をコードする cDNA を探索する。この方法では、MPL の細胞表面への発現による、IL-3 依存性の細胞株への自律増殖能の賦与を指標とするため、簡便に目的のクローンを選別できる。

本発明者等は、 9×10^5 個のクローンをスクリーニングした結果、膜または可溶性蛋白質をコードする可能性がある新規遺伝子を 8 個を同定することに成功した。そのうち、7 個をそれぞれ「#101」から「#107」と命名した。

これら遺伝子は、脂肪細胞の分化に関連した発現を示した。また、発現する組織は異なるものの、組織特異的な発現を示した。従って、これら遺伝子は、機能部位は異なるが、それぞれが生体内において脂肪細胞の分化に関連した役割を担う分子であると考えられる。

本発明は、脂肪細胞に由来し、シグナル配列を有する新規な蛋白質、その遺伝子、およびそれらと機能的に同等な分子、並びにそれらの製造および用途に関し、より具体的には、

(1) 下記 (a) から (f) のいずれかに記載の DNA、

(a) 配列番号：8～11のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA。

(b) 配列番号：1～7のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。

(c) 配列番号：8～11のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：8～11のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA。

(d) 配列番号：1、2、7のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA に対応する全長 DNA によりコードされる蛋白質のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、該全長 DNA によりコードされる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA。

(e) 配列番号：3～6のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、配列番号：8～11に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA。

(f) 配列番号：1、2、7のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、これら DNA に対応する全長 DNA によりコードされる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA。

(2) 配列番号：8～11のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードする DNA、

(3) (1) または (2) に記載の DNA によりコードされる蛋白質またはペプチド、

(4) (1) または (2) に記載の DNA が挿入されたベクター、

(5) (1) または (2) に記載の DNA または (4) に記載のベクターを保持する宿主細胞、

(6) (5)に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から発現させた蛋白質を回収する工程を含む、(3)に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法、

(7) (3)に記載の蛋白質に結合する抗体、

(8) 配列番号：1から7のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、および

(9) (3)に記載の蛋白質に結合する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該蛋白質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、

(c) 該蛋白質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、を提供するものである。

本発明は、脂肪細胞に由来し、シグナル配列を有する新規な蛋白質をコードする遺伝子を提供する。本発明者等は、分泌型および膜蛋白質をコードする脂肪細胞由来 cDNA を、最近確立された新規シグナル配列トラップ法、SST-REX 法によって検索し、既知の cDNA 63 個および新規 cDNA 8 個を得た。本発明者等により SST-REX 法を利用して単離された新規 cDNA のうち、7 つの cDNA (これらクローンをそれぞれ「#101」～「#107」と命名した。また、これらクローンをまとめて「#10X」と称する。)の塩基配列をそれぞれ配列番号：1～7に示した。また、#103 から #106 cDNA によりコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号：8～11に示した。

SST-REX 法により単離された 63 個の cDNA 全てが既知の蛋白質 28 個の cDNA の 5' 配列を含むことが判明し、それらの全てが膜または分泌型蛋白質であった。クローン 63 個 (79%) 中、50 個は分泌型蛋白質であった。これは脂肪細胞が分

泌臓器を構築する細胞としての集団を有することを示している。特にクローン 63 個中 28 個 (44%) は、コラーゲンのような細胞外マトリクスまたは関連蛋白質であった。繊維芽細胞の細胞外マトリックス蛋白質分泌能は、脂肪細胞への分化の際に増強されることが示された。コラーゲン α -1 (IV) および α -2 (IV) の合成および分泌は、繊維芽細胞では無視できる程度であるが、脂肪細胞では顕著に増加している。エンタクチンの分泌増強もまた認められた (Aratani, Y. and Kitagawa, Y. (1988) J. Biol. Chem. 263, 16163-16169)。本発明者等により示された結果は、これらの結果と一致しており、細胞外マトリックス蛋白質の合成が脂肪組織の形態形成にとって重要であることを示唆している。

また、10 個のクローンは、コラーゲン・リピート (Scherer, P. E. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 26746-26749) を有する 30kDa (Acrp30) の脂肪細胞補体関連蛋白質であった。Acrp30 mRNA は脂肪細胞分化の際に 100 倍以上誘導される。従って、分泌型蛋白質 50 個中 10 個 (20%) が Acrp30 であった。

また、リポ蛋白質リパーゼ (LPL) クローンは 2 個存在した。LPL は、脂肪の蓄積に関係する脂肪細胞特異的遺伝子であり、その発現は脂肪細胞では PPAR γ によって増強される。SST-REX 法による脂肪細胞 cDNA ライブラリのスクリーニングによって LPL 遺伝子が得られたことは妥当である。一方、シンデカン-1 およびライソゾーム膜糖蛋白質タイプ A のような蛋白質は、ハウスキーピング遺伝子である可能性がある。

ノザンプロット分析によって、脂肪細胞 cDNA ライブラリから得られたほとんどの SST クローンは、脂肪細胞特異的発現パターンを示した。前脂肪細胞から脂肪細胞への分化は、遺伝子発現パターンを劇的に変化させるかもしれない。クローン #103 は、3T3-L1 前脂肪細胞ではほとんど発現されなかったが、コンフルエント細胞および脂肪細胞では認められた。一つの可能性は、それがリポ蛋白質リパーゼ、コラーゲンおよび FAAR (脂肪酸活性化受容体) のような脂肪細胞分化の初期マーカーであることかも知れない (MacDougald, O. A. and Lane, M. D. (1

995) Annu.Rev.Biochem. 64, 345-375)。初期マーカー遺伝子の発現はその後の前脂肪細胞分化にとって必須であるため、本質的で重要である。特にクローン#106 mRNA のレベルは分化の際に増加した。従って、これは脂肪細胞分化に関連する可能性がある。クローン#105 の発現は興味深い。2つの転写物がノザンブロット分析によって検出された。2つの転写物は異なる遺伝子に由来する可能性もある。

さらに、ノザンブロット分析により、#103 では分化誘導後初期の段階で一時的にほとんど発現が消失した。3T3-L1 を脂肪細胞に分化誘導すると、まず一部の細胞が分裂・増殖し、それが脂肪細胞になるという説がある。また活発に増殖している対数期の 3T3-L1 細胞でも発現量が少なく、細胞の増殖が止まったコンフルエントや分化した脂肪細胞では発現量が亢進していることから、この#103 遺伝子は脂肪細胞の分化において重要な役割を演じているのみならず、一般的に細胞の増殖・休止に関与している、またはマーカー遺伝子である可能性がある。#105 では分化誘導後 2 日目までは高分子量のバンドが見られるが、3 日目からは低分子量のバンドのみが見られるなど、脂肪細胞の分化を考える上で重要な意味がある可能性がある。

また、インスリン添加により#105 遺伝子の発現が抑制されたことから、インスリンを介したシグナル伝達にこの遺伝子が関与している可能性があり、糖尿病等の治療や予防にとって重要な意味がある可能性がある。

また、#104 遺伝子のヒトホモログの塩基配列がジーンバンクに登録され、その説明によると肝臓の系で癌化によって発現が亢進するということである。様々な癌の細胞株で#104 の発現が見られ、その発現パターンが異なっていた。癌の種類によってこの#104 遺伝子の発現が見られるものとそうでないものがあり、この#104 遺伝子と癌との間に何らかの因果関係がある可能性がある。

本発明者等により単離された#10X クローンのうち、#101、#102、および#107 は全長配列ではない。しかしながら、当業者においては、これら断片に対応する

全長遺伝子を単離する手法は技術常識となっている。例えば、当業者であれば、これら断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行なうことにより全長遺伝子を単離することができる。従って、本発明には、これら断片に対応する全長遺伝子が含まれる。

本発明は、また、#10X 蛋白質（配列番号：8～11に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号：1，2，7に対応する全長 DNA がコードする蛋白質）と機能的に同等な蛋白質を包含する。このような蛋白質には、例えば、これら蛋白質の変異体、マウス以外の生物のホモログ等が含まれる。ここで「機能的に同等」とは、対象となる蛋白質が#10X 蛋白質と同様に、シグナル配列を有する蛋白質としての機能を有することを指す。このような機能としては、例えば、国際公開番号 WO 00/00610 に記載されている機能や分泌蛋白質としての機能が考えられる。目的の蛋白質が分泌蛋白質であるか否かは、以下の手法により判定することができる。

まず、#10X 遺伝子の 3' 末端に市販のペプチド（例えば、His-tag あるいは FLAG 等）をコードする遺伝子を連結させた融合遺伝子を作製する。次に、その融合遺伝子を動物細胞用発現ベクター（例えば、pcDNA3 あるいは pCOS-1 等）を用いて動物細胞（例えば、COS 細胞等）に導入し、#10X 蛋白質をペプチドとの融合蛋白質として発現させる。この融合蛋白質が培養上清中に分泌するか否かを、該ペプチドに対する抗体を用いて ELISA、ウェスタンブロッティング、あるいは免疫沈降によって評価する。

分泌蛋白質には、種々の産業上の利点がある。例えば、ある組換え蛋白質を取得することを望む場合に、該蛋白質を分泌蛋白質またはその分泌能を有する部分ペプチドとの融合蛋白質として細胞内で発現させれば、融合蛋白質が細胞外へ分泌され、組換え蛋白質の精製が容易になるという利点がある。また、多くの分泌蛋白質が有用な医薬品となっていることから、それ自体に医薬品としての応用も考えられる。

本発明の蛋白質は、脂肪細胞に由来すると共に、脂肪細胞の分化に関連した発現を示した。従って、本発明の遺伝子や蛋白質、あるいは該蛋白質の発現や活性を調節する化合物は、これらに制限されないが、例えば、肥満、高脂血症、糖尿病、動脈硬化などの疾患の治療や予防への応用が考えられる。

ある蛋白質と機能的に同等な蛋白質を調製するための、当業者によく知られた方法としては、蛋白質に変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275, Zoller, MJ, and Smith, M. (1983) Methods Enzymol. 100, 468-500、Kramer, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456, Kramer W, and Fritz HJ (1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367, Kunkel, TA (1985) Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492, Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766) などを用いて、#10X 蛋白質 (配列番号: 8~11 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号: 1, 2, 7 に対応する全長 DNA がコードする蛋白質) のアミノ酸に適宜変異を導入することにより、該蛋白質と機能的に同等な蛋白質を調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このように、#10X 蛋白質のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列を有し、該蛋白質と機能的に同等な蛋白質もまた本発明の蛋白質に含まれる。このような変異体における、変異するアミノ酸数は、通常、50 アミノ酸以内であり、好ましくは 30 アミノ酸以内であり、さらに好ましくは 10 アミノ酸以内 (例えば、5 アミノ酸以内) であると考えられる。

変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水性アミノ酸 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G, A, V, L, I, P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S, T, Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C, M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D, N, E, Q

)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R、K、H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H、F、Y、W) を挙げることができる (括弧内はいずれもアミノ酸の一字標記を表す)。

あるアミノ酸配列に対する 1 又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有する蛋白質がその生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M.J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

#10X 蛋白質のアミノ酸配列に複数個のアミノ酸残基が付加された蛋白質には、これら蛋白質を含む融合蛋白質が含まれる。融合蛋白質は、これら蛋白質と他のペプチド又は蛋白質とが融合したものであり、本発明に含まれる。融合蛋白質を作製する方法は、#10X 蛋白質 (配列番号: 8~11 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号: 1, 2, 7 に対応する全長 DNA がコードする蛋白質) をコードする DNA と他のペプチド又は蛋白質をコードする DNA をフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、当業者に公知の手法を用いることができる。本発明の蛋白質との融合に付される他のペプチド又は蛋白質としては、特に限定されない。

本発明の蛋白質との融合に付される他のペプチドとしては、例えば、FLAG (Hopp, T.P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6 個の His (ヒスチジン) 残基からなる 6×His、10×His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒト c-myc の断片、VSV-GP の断片、p18HIV の断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T 抗原の断片、lck tag、 α -tubulin の断片、B-tag、Protein C の断片等の公知のペプチドを使用することができる。また、本発明の蛋白質との融合に付される他の蛋白質としては、例えば、GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、H

A (インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 β -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合蛋白質) 等が挙げられる。市販されているこれらペプチドまたは蛋白質をコードする DNA を本発明の蛋白質をコードする DNA と融合させ、これにより調製された融合 DNA を発現させることにより、融合蛋白質を調製することができる。

また、#10X 蛋白質のアミノ酸配列から複数個のアミノ酸残基が欠失した蛋白質には、これら蛋白質からシグナル配列が除去された蛋白質が含まれる。

ある蛋白質と機能的に同等な蛋白質を調製する当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術 (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、#10X 蛋白質をコードする DNA 配列 (配列番号: 1~7) もしくはその一部を基に、これと相同性の高い DNA を単離して、該 DNA から #10X 蛋白質と機能的に同等な蛋白質を単離することも通常行いうることである。

本発明には、#10X 蛋白質をコードする DNA とハイブリダイズする DNA がコードし、#10X 蛋白質と機能的に同等な蛋白質が含まれる。このような蛋白質としては、例えば、マウスおよび他の哺乳動物のホモログ (例えば、ヒト、ラット、ウサギ、ウシなどがコードする蛋白質) が挙げられる。

#10X 蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA を単離するためのハイブリダイゼーションの条件は、当業者であれば適宜選択することができる。ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば 42°C、0.1×SSC、0.1%SDS の条件であり、好ましくは 50°C、0.1×SSC、0.1%SDS の条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば 65°C、5×SSC 及び 0.1%SDS の条件である。これらの条件におい

て、温度を上げる程に高い相同性を有する DNA が効率的に得られることが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

また、ハイブリダイゼーションにかえて、#10X 蛋白質をコードする DNA (配列番号：1 から 7) の配列情報を基に合成したプライマーを用いる遺伝子増幅法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法を利用して単離することも可能である。

これらハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術により単離される DNA がコードする、#10X 蛋白質と機能的に同等な蛋白質は、通常、#10X 蛋白質 (配列番号：8 ~ 11 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、配列番号：1, 2, 7 に対応する全長 DNA がコードする蛋白質) とアミノ酸配列において高い相同性を有する。本発明の蛋白質には、#10X 蛋白質と機能的に同等であり、かつ該蛋白質のアミノ酸配列と高い相同性を有する蛋白質も含まれる。高い相同性とは、アミノ酸レベルにおいて、通常、少なくとも 50% 以上の同一性、好ましくは 75 % 以上の同一性、さらに好ましくは 85% 以上の同一性、さらに好ましくは 95 % 以上の同一性を指す。アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、Karlin and Altschul によるアルゴリズム BLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993) によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTN や BLASTX と呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLASTN によって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 100、wordlength = 12 とする。また、BLASTX によってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 50、wordlength = 3 とする。BLAST と Gapped BLAST プログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

本発明の蛋白質は、後述するそれを産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態などが異なり得る。しかしながら、得られた蛋白質が、#10X 蛋白質と同等の機能を有している限り、本発明に含まれる。例えば、本発明の蛋白質を原核細胞、例えば大腸菌で発現させた場合、本来の蛋白質のアミノ酸配列の N 末端にメチオニン残基が付加される。本発明の蛋白質はこのような蛋白質も包含する。

本発明の蛋白質は、当業者に公知の方法により、組み換え蛋白質として、また天然の蛋白質として調製することが可能である。組み換え蛋白質であれば、本発明の蛋白質をコードする DNA(例えば、配列番号：1 から 7 に記載の塩基配列を有する DNA)を、適当な発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して得た形質転換体を回収し、抽出物を得た後、イオン交換、逆相、ゲル濾過などのクロマトグラフィー、あるいは本発明の蛋白質に対する抗体をカラムに固定したアフィニティークロマトグラフィーにかけることにより、または、さらにこれらのカラムを複数組み合わせることにより精製し、調製することが可能である。

また、本発明の蛋白質をグルタチオン S-トランスフェラーゼ蛋白質との融合蛋白質として、あるいはヒスチジンを複数付加させた組み換え蛋白質として宿主細胞（例えば、動物細胞や大腸菌など）内で発現させた場合には、発現させた組み換え蛋白質はグルタチオンカラムあるいはニッケルカラムを用いて精製することができる。融合蛋白質の精製後、必要に応じて融合蛋白質のうち、目的の蛋白質以外の領域を、トロンビンまたはファクター Xa などにより切断し、除去することも可能である。

天然の蛋白質であれば、当業者に周知の方法、例えば、本発明の蛋白質を発現している組織や細胞の抽出物に対し、後述する本発明の蛋白質に結合する抗体が結合したアフィニティークラムを作用させて精製することにより単離することが

できる。抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。

本発明は、また、本発明の蛋白質の部分ペプチドを包含する。本発明の部分ペプチドは、少なくとも7アミノ酸以上、好ましくは8アミノ酸以上、さらに好ましくは9アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。該部分ペプチドは、例えば、本発明の蛋白質に対する抗体の作製、本発明の蛋白質に結合する化合物のスクリーニングや、本発明の蛋白質の促進剤や阻害剤のスクリーニングに利用し得る。また、本発明の蛋白質のアンタゴニストや競合阻害剤になり得る。本発明の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明の蛋白質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成は、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによってもよい。

本発明の蛋白質をコードするDNAは、上述したような本発明の蛋白質の *in vivo* や *in vitro* における生産に利用される他、例えば、本発明の蛋白質をコードする遺伝子の異常に起因する疾患や本発明の蛋白質により治療可能な疾患の遺伝子治療などへの応用も考えられる。本発明のDNAは、本発明の蛋白質をコードしうるものであればいかなる形態でもよい。即ち、mRNAから合成されたcDNAであるか、ゲノムDNAであるか、化学合成DNAであるかなどを問わない。また、本発明の蛋白質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。

本発明のDNAは、当業者に公知の方法により調製することができる。例えば、本発明の蛋白質を発現している細胞よりcDNAライブラリーを作製し、本発明のDNAの配列（例えば、配列番号：1から7）の一部をプローブにしてハイブリダイゼーションを行うことにより調製できる。cDNAライブラリーは、例えば、文献（Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)）に記載の方法により調製してもよいし、市販のDNAライブラリーを用いてもよい。また、本発明の蛋白質を発現している細胞よりRNA

を調製し、逆転写酵素により cDNA を合成した後、本発明の DNA の配列（例えば、配列番号：1 から 7）に基づいてオリゴ DNA を合成し、これをプライマーとして用いて PCR 反応を行い、本発明の蛋白質をコードする cDNA を増幅させることにより調製することも可能である。

また、得られた cDNA の塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳領域を決定でき、本発明の蛋白質のアミノ酸配列を得ることができる。また、得られた cDNA をプローブとしてゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、ゲノム DNA を単離することができる。

具体的には、次のようにすればよい。まず、本発明の蛋白質を発現する細胞、組織、臓器（例えば、脂肪細胞や本実施例におけるノザンプロッティングにより発現が認められた組織）から、mRNA を単離する。mRNA の単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J.M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC 法(Chomczynski, P. and Sacchi, N., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等により全 RNA を調製し、mRNA Purification Kit(Pharmacia)等を使用して全 RNA から mRNA を精製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit(Pharmacia)を用いることにより mRNA を直接調製することもできる。

得られた mRNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成する。cDNA の合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化学工業)等を用いて行うこともできる。また、本明細書に記載されたプライマー等を用いて、5'-Ampli FINDER RACE Kit(Clontech 製)およびポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction; PCR)を用いた 5'-RACE 法(Frohman, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)にしたがい、cDNA の合成および増幅を行うことができる。

得られた PCR 産物から目的とする DNA 断片を調製し、ベクター DNA と連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選

択して所望の組換えベクターを調製する。目的とする DNA の塩基配列は、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認することができる。

また、本発明の DNA においては、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い塩基配列を設計することができる (Grantham, R. et al., *Nucleic Acids Research* (1981) 9, r43-74)。また、本発明の DNA は、市販のキットや公知の方法によって改変することができる。改変としては、例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当な DNA フラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン (ATG) 及び／又は終止コドン (TAA、TGA、又は TAG) の挿入等が挙げられる。

本発明の DNA は、具体的には、配列番号：1 の塩基配列において 1 位の塩基 c から 165 位の塩基 g までの塩基配列からなる DNA または該塩基配列を含む DNA、配列番号：2 の塩基配列において 1 位の塩基 g から 438 位の塩基 t までの塩基配列からなる DNA または該塩基配列を含む DNA、配列番号：3 の塩基配列において 83 位の塩基 a から 1408 位の塩基 a までの塩基配列からなる DNA または該塩基配列を含む DNA、配列番号：4 の塩基配列において 214 位の塩基 a から 1662 位の塩基 g までの塩基配列からなる DNA または該塩基配列を含む DNA、配列番号：5 の塩基配列において 289 位の塩基 a から 1407 位の塩基 c までの塩基配列からなる DNA または該塩基配列を含む DNA、配列番号：6 の塩基配列において 86 位の塩基 a から 3244 位の塩基 a までの塩基配列からなる DNA または該塩基配列を含む DNA、および配列番号：7 の塩基配列において 1 位の塩基 c から 522 位の塩基 c までの塩基配列からなる DNA または該塩基配列を含む DNA を包含する。

本発明の DNA はまた、配列番号：1 から 7 に示す塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA であり、且つ上記本発明の蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA を含む。ハイブリダイゼーションにおける条件は当業者であれば適宜選択することができるが、具体的には上記した条件を用いることができ

る。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有する DNA を得ることができる。上記のハイブリダイズする DNA は、好ましくは天然由来の DNA、例えば cDNA 又は染色体 DNA である。

本発明は、また、本発明の DNA が挿入されたベクターを提供する。本発明のベクターとしては、宿主細胞内において本発明の DNA を保持したり、本発明の蛋白質を発現させるために有用である。

ベクターとしては、例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5 α 、HB101、XL1Blue）などで大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子（例えば、なんらかの薬剤（アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すれば特に制限はない。ベクターの例としては、M13 系ベクター、pUC 系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Script などが挙げられる。また、cDNA のサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7 などが挙げられる。本発明の蛋白質を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主を JM109、DH5 α 、HB101、XL1-Blue などの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZ プロモーター（Ward ら、Nature (1989) 341, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427）、araB プロモーター（Better ら、Science (1988) 240, 1041-1043）、または T7 プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他に pGEX-5X-1（ファルマシア社製）、「QIAexpress system」（キアゲン社製）、pEGFP、または pET（この場合、宿主は T7 RNA ポリメラーゼを発現している BL21 が好ましい）などが挙げられる。

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。蛋白質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelB シグナル配列 (Lei, S.P. et al J.Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

大腸菌以外にも、例えば、本発明の蛋白質を製造するためのベクターとしては、哺乳動物由来の発現ベクター (例えば、pcDNA3(インビトロゲン社製) や、pEGF-BOS(Nucleic Acids.Res.1990, 18(17),p5322)、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター (例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(ギブコ BRL 社製)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター (例えば pMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター (例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター (例えば、pZIPneo)、酵母由来の発現ベクター (例えば、「Pichia Expression Kit」(インビトロゲン社製)、pNV11、SP-Q01)、枯草菌由来の発現ベクター (例えば、pPL608、pKTH50) が挙げられる。

CHO 細胞、COS 細胞、NIH3T3 細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えば SV40 プロモーター (Mulligan ら, Nature (1979) 277, 108)、MMLV-LTR プロモーター、EF1 α プロモーター (Mizushima ら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMV プロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子 (例えば、薬剤 (ネオマイシン、G418 など) により判別できるような薬剤耐性遺伝子) を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13 などが挙げられる。

さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損した CHO 細胞にそれを相補する DHFR 遺伝子を有するベクター (例えば、pCHOI など) を導入し、メトトレキセー

ト (MTX) により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T 抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つ COS 細胞を用いて SV40 の複製起点を持つベクター (pcD など) で形質転換する方法が挙げられる。複製開始点としては、また、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシバビローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることもできる。さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogp t) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

一方、動物の生体内で本発明の DNA を発現させる方法としては、本発明の DNA を適当なベクターに組み込み、例えば、レトロウィルス法、リボソーム法、カチオニックリボソーム法、アデノウィルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。これにより、本発明の #10X 遺伝子の変異に起因する疾患に対する遺伝子治療を行うことが可能である。用いられるベクターとしては、例えば、アデノウィルスベクター (例えば pAdexlcw) やレトロウィルスベクター (例えば pZIPneo) などが挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへの本発明の DNA の挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である (Molecular Cloning , 5.61-5.63)。生体内への投与は、ex vivo 法であっても、in vivo 法であってもよい。

また、本発明は、本発明のベクターが導入された宿主細胞を提供する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。本発明の宿主細胞は、例えば、本発明の蛋白質の製造や発現のための産生系として使用することができる。蛋白質製造のための産生系は、in vitro および in vivo の産生系がある。in vitro の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO (J.Exp.Med. (1995) 108, 945)、COS、3T3、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞 (Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340)、あるいは昆虫細胞、例えば、Sf9、Sf21、Tn5 が知られている。CHO 細胞としては、特に、DHFR 遺伝子を欠損した CHO 細胞である dhfr-CHO (Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1980) 77, 4216-4220) や CHO K-1 (Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1968) 60, 1275) を好適に使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特に CHO 細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、カチオニックリボソーム DOTAP (ペーリンガー・マンハイム社製) を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が蛋白質生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、例えば、JM109、DH5 α 、HB101 等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

これらの細胞を目的とする DNA により形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより蛋白質が得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM を使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を

併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時の pH は、約 6~8 であるのが好ましい。培養は、通常、約 30~40°C で約 15~200 時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

一方、*in vivo* で蛋白質を産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とする DNA を導入し、動物又は植物の体内で蛋白質を産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

例えば、目的とする DNA を、ヤギ β カゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含む DNA 断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、目的の蛋白質を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生される蛋白質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的の蛋白質をコードする DNA を挿入したバキュロウィルスのカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的の蛋白質を得ることができる (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とする蛋白質をコードする DNA を植物発現用ベクター、例えば pMON 530 に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス

(*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得ることができる (Julian K.-C. Ma et al., *Eur.J.Immunol.* (1994) 24, 131-138)。

これにより得られた本発明の蛋白質は、宿主細胞内または細胞外 (培地など) から単離し、実質的に純粋で均一な蛋白質として精製することができる。蛋白質の分離、精製は、通常の蛋白質の精製で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせれば蛋白質を分離、精製することができる。

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996) 。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えば HPLC、FPLC 等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製された蛋白質も包含する。

なお、蛋白質を精製前又は精製後に適当な蛋白質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。蛋白質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。

本発明は、また、本発明の蛋白質と結合する抗体を提供する。本発明の抗体の形態には、特に制限はなく、ポリクローナル抗体の他、モノクローナル抗体も含まれる。また、ウサギなどの免疫動物に本発明の蛋白質を免疫して得た抗血清、

すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、さらにヒト抗体や遺伝子組み換えによるヒト型化抗体も含まれる。

抗体取得の感作抗原として使用される本発明の蛋白質は、その由来となる動物種に制限されないが哺乳動物、例えばヒト、マウス又はラット由来の蛋白質が好ましく、特にヒト由来の蛋白質が好ましい。ヒト由来の蛋白質は、本明細書に開示される遺伝子配列又はアミノ酸配列を用いて得ることができる。

本発明において、感作抗原として使用される蛋白質は、完全な蛋白質であってもよいし、また、蛋白質の部分ペプチドであってもよい。蛋白質の部分ペプチドとしては、例えば、蛋白質のアミノ基 (N) 末端断片やカルボキシ (C) 末端断片が挙げられる。本明細書で述べる「抗体」とは蛋白質の全長又は断片に反応する抗体を意味する。

本発明の蛋白質又はその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入し、該ベクターで本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させ、該宿主細胞内外から目的の蛋白質又はその断片を公知の方法で得て、これらを感作抗原として用いればよい。また、蛋白質を発現する細胞又はその溶解物あるいは化学的に合成した本発明の蛋白質を感作抗原として使用してもよい。短いペプチドは、キーホールリンベットヘモシアニン、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミンなどのキャリア蛋白質と適宜結合させて抗原とすることが好ましい。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的には、げっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えば、サルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界ザル）、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。一般的方法としては、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は皮下に注射する。具体的には、感作抗原をPBS(Phosphate-Buffered Saline)や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものに対し、所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与する。さらに、その後、フロイント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4~21日毎に数回投与することが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

ここで、本発明の蛋白質に対するポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離して、これを使用してもよい。例えば、本発明の蛋白質をカップリングさせたアフィニティーカラムを用いて、本発明の蛋白質のみを認識する画分を得て、さらにこの画分をプロテインAあるいはプロテインGカラムを利用して精製することにより、免疫グロブリンGあるいはMを調製することができる。

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞選別のための特性を獲得したミエローマ細胞が挙げられる。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46)等に準じて行うことができる。

細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常の実験培養液、例えば、HAT 培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該 HAT 培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常、数日～数週間継続して行う。次いで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングを行う。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えば EB ウィルスに感染したヒトリンパ球を *in vitro* で蛋白質、蛋白質発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えば U266 と融合させ、蛋白質への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭 63-17688 号公報）。

次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテイン A、プロテイン G カラム、DEAE イオン交換クロマトグラフィー、本発明の蛋白質をカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。本発明の抗体は、本発明の蛋白質の精製、検出に用いられる他、本発明の蛋白質のアゴニストやアンタゴニストの候補になる。また、この抗体を本発明の蛋白質が関与する疾患の抗体治療へ応用することも考えられる。得られた抗体を人体に投与する目的（抗体治療）で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型抗体が好ましい。

例えば、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となる蛋白質、蛋白質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得

し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いて蛋白質に対するヒト抗体を取得することができる（国際公開番号 W092-03918、W093-2227、W094-02602、W094-25585、W096-33735 および W096-34096 参照）。

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子(oncogene)により不死化させた細胞を用いてもよい。

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる（例えば、Borrebaeck, C.A.K. and Larrick, J.W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードする DNA をハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

さらに、本発明の抗体は、本発明の蛋白質に結合する限り、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv 又は H 鎖と L 鎖の Fv を適当なリンカーで連結させたシングルチェーン Fv(scFv)(Huston, J.S. et al., Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M.S. et al., J.Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A.H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R.E. and Walker, B.W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137 参照）。

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

また、本発明の抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体又は非ヒト抗体由来の CDR (相補性決定領域) とヒト抗体由来の FR (フレームワーク領域) 及び定常領域からなるヒト型化抗体として得ることができる。

前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で使用する抗体の分離、精製は通常の蛋白質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる (Antibodies: A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) が、これらに限定されるものではない。上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又は酵素結合免疫吸着検定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA) 等により行うことができる。

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテイン A カラム、プロテイン G カラムが挙げられる。例えば、プロテイン A カラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F.F. (Pharmacia) 等が挙げられる。

アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press,

1996)。これらのクロマトグラフィーは HPLC、FPLC 等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法)あるいは蛍光抗体法を用いることができる。ELISA を用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明の蛋白質を添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えば、アルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーションし、次いで洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。蛋白質として蛋白質の断片、例えばその C 末端からなる断片を使用してもよい。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia 製)を使用することができる。

これらの手法を用いることにより、本発明の抗体と試料中に含まれる本発明の蛋白質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該蛋白質との免疫複合体を検出又は測定することからなる、本発明の蛋白質の検出又は測定方法を実施することができる。本発明の蛋白質の検出又は測定方法は、蛋白質を特異的に検出又は測定することができるため、蛋白質を用いた種々の実験等に有用である。

本発明はまた、#10X 蛋白質をコードする DNA (配列番号：1 から 7) またはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを提供する。

ここで「相補鎖」とは、A:T (ただし RNA の場合は U)、G:C の塩基対からなる 2 本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは 90%、さら

に好ましくは 95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。

このような核酸には、本発明の蛋白質をコードする DNA の検出や増幅に用いるプローブやプライマー、該 DNA の発現を検出するためのプローブやプライマー、本発明の蛋白質の発現を制御するためのヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム、またはこれらをコードする DNA 等）が含まれる。また、このような核酸は、DNA チップの作製に利用することもできる。

プライマーとして用いる場合、3' 側の領域は相補的とし、5' 側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、例えば、配列番号：1 から 7 の塩基配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：1 から 7 の塩基配列中の連続する少なくとも 15 個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、連続する少なくとも 15 個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA 又は mRNA の所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補配列であるもののみならず、DNA または mRNA とオリゴヌクレオチドとが配列番号：1 から 7 に示される塩基配列に特異的にハイブリダイズできる限り、1 又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在しているものも含まれる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明の蛋白質の産生細胞に作用して、該蛋白質をコードする DNA 又は mRNA に結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNA の分解を促進したりして、本発明の蛋白質の発現を抑制することにより、結果的に本発明の蛋白質の作用を抑制する効果を有する。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤等の外用剤とすることができる。

また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散財、顆粒剤、カプセル剤、リボソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法にしたがって調製することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は患者の患部に直接適用するか、又は血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用する。さらには、持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リボソーム、ポリ-L-リジン、リビッド、コレステロール、リボフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.1~100mg/kg、好ましくは 0.1~50mg/kg の範囲で投与することができる。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは本発明の蛋白質の発現を阻害し、従って本発明の蛋白質の生物学的活性を抑制することにおいて有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する発現阻害剤は、本発明の蛋白質の生物学的活性を抑制することが可能である点で有用である。

本発明の蛋白質は、これに結合する化合物のスクリーニングに有用である。すなわち、本発明の蛋白質と、該蛋白質に結合する化合物を含むと予想される被検試料とを接触せしめ、そして本発明の蛋白質に結合する活性を有する化合物を選

択する、ことからなる本発明の蛋白質に結合する化合物をスクリーニングする方法において使用される。

スクリーニングに用いられる本発明の蛋白質は組換え蛋白質であっても、天然由来の蛋白質であってもよい。また部分ペプチドであってもよい。また細胞表面に発現させた形態、または膜画分としての形態であってもよい。被検試料としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製蛋白質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。被検試料を接触させる本発明の蛋白質は、例えば、精製した蛋白質として、可溶型蛋白質として、担体に結合させた形態として、他の蛋白質との融合蛋白質として、細胞膜上に発現させた形態として、膜画分として被検試料に接触させることができる。

本発明の蛋白質を用いて、例えば該蛋白質に結合する蛋白質をスクリーニングする方法としては、当業者に公知の多くの方法を用いることが可能である。このようなスクリーニングは、例えば、免疫沈降法により行うことができる。具体的には、以下のように行うことができる。本発明の蛋白質をコードする遺伝子を、pSV2neo, pcDNA I, pCD8 などの外来遺伝子発現用のベクターに挿入することで動物細胞などで当該遺伝子を発現させる。発現に用いるプロモーターとしては SV40 early promoter(Rigby In Williamson (ed.), Genetic Engineering, Vol .3. Academic Press, London, p.83-141(1982)), EF-1 α promoter(Kimら Gene 91, p.217-223 (1990)), CAG promoter(Niwa et al. Gene 108, p.193-200 (1991)), RSV LTR promoter(Cullen Methods in Enzymology 152, p.684-704 (1987)), SR α promoter(Takebe et al. Mol.Cell.Biol. 8, p.466 (1988)), CMV immediate early promoter(Seed and Aruffo Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84, p.3365-3369 (1987)), SV40 late promoter(Gheysen and Fiers J.Mol.A ppl.Genet. 1, p.385-394 (1982)), Adenovirus late promoter(Kaufman et a

1. Mol. Cell. Biol. 9, p. 946 (1989)), HSV TK promoter 等の一般的に使用できるプロモーターであれば何を用いてもよい。

動物細胞に遺伝子を導入することで外来遺伝子を発現させるためには、エレクトロポレーション法(Chu, G. et al. Nucl. Acid Res. 15, 1311-1326 (1987))、リン酸カルシウム法(Chen, C and Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752 (1987))、DEAE デキストラン法(Lopata, M.A. et al. Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717 (1984); Sussman, D.J. and Milman, G. Mol. Cell. Biol. 4, 1642-1643 (1985))、リポフェクチン法(Derijard, B. Cell 7, 1025-1037 (1994); Lamb, B.T. et al. Nature Genetics 5, 22-30 (1993); Rabindran, S.K. et al. Science 259, 230-234 (1993))等の方法があるが、いずれの方法によってもよい。

特異性の明らかとなっているモノクローナル抗体の認識部位(エピトープ)を本発明の蛋白質のN末またはC末に導入することにより、モノクローナル抗体の認識部位を有する融合蛋白質として本発明の蛋白質を発現させることができる。用いるエピトープ-抗体系としては市販されているものを利用することができる(実験医学 13, 85-90 (1995))。マルチクローニングサイトを介して、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白質、グルタチオン S-トランスフェラーゼ、緑色蛍光蛋白質(GFP)などとの融合蛋白質を発現することができるベクターが市販されている。

融合蛋白質にすることにより本発明の蛋白質の性質をできるだけ変化させないようにするために数個から十数個のアミノ酸からなる小さなエピトープ部分のみを導入して、融合蛋白質を調製する方法も報告されている。例えば、ポリヒスチジン(His-tag)、インフルエンザ凝集素HA、ヒトc-myc、FLAG、Vesicular stomatitis ウイルス糖蛋白質(VSV-GP)、T7 gene10 蛋白質(T7-tag)、ヒト単純ヘルペスウイルス糖蛋白質(HSV-tag)、E-tag(モノクローナルファージ上のエピトープ)などのエピトープとそれを認識するモノクローナル抗体を、本発

明の蛋白質に結合する蛋白質のスクリーニングのためのエピトープ-抗体系として利用できる（実験医学 13, 85-90 (1995)）。

免疫沈降においては、これらの抗体を、適当な界面活性剤を利用して調製した細胞溶解液に添加することにより免疫複合体を形成させる。この免疫複合体は本発明の蛋白質、それと結合能を有する蛋白質、および抗体からなる。上記エピトープに対する抗体を用いる以外に、本発明の蛋白質に対する抗体を利用して免疫沈降を行うことも可能である。本発明の蛋白質に対する抗体は、例えば、本発明の蛋白質をコードする遺伝子を適当な大腸菌発現ベクターに導入して大腸菌内で発現させ、発現させた蛋白質を精製し、これをウサギやマウス、ラット、ヤギ、ニワトリなどに免疫することで調製することができる。また、合成した本発明の蛋白質の部分ペプチドを上記の動物に免疫することによって調製することもできる。

免疫複合体は、例えば、抗体がマウス IgG 抗体であれば、Protein A Sepharose や Protein G Sepharose を用いて沈降させることができる。また、本発明の蛋白質を、例えば、GST などのエピトープとの融合蛋白質として調製した場合には、グルタチオン-Sepharose 4B などのこれらエピトープに特異的に結合する物質を利用して、本発明の蛋白質の抗体を利用した場合と同様に、免疫複合体を形成させることができる。

免疫沈降の一般的な方法については、例えば、文献（Harlow, E. and Lane, D. : Antibodies, pp.511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988)）記載の方法に従って、または準じて行えばよい。

免疫沈降された蛋白質の解析には SDS-PAGE が一般的であり、適当な濃度のゲルを用いることで蛋白質の分子量により結合していた蛋白質を解析することができる。また、この際、一般的には本発明の蛋白質に結合した蛋白質は、クマシー染色や銀染色といった蛋白質の通常の染色法では検出することは困難であるので、放射性同位元素である ^{35}S -メチオニンや ^{35}S -システインを含んだ培養液で細胞

を培養し、該細胞内の蛋白質を標識して、これを検出することで検出感度を向上させることができる。蛋白質の分子量が判明すれば直接 SDS-ポリアクリルアミドゲルから目的の蛋白質を精製し、その配列を決定することもできる。

また、本発明の蛋白質を用いて、該蛋白質に結合する蛋白質を単離する方法としては、例えば、ウエストウエスタンブロッティング法 (Skolnik, E.Y. et al., Cell (1991) 65, 83-90) を用いて行うことができる。すなわち、本発明の蛋白質と結合する蛋白質を発現していることが予想される細胞、組織、臓器(例えば、脂肪細胞や実施例におけるノザンブロッティングにより発現が認められた組織) よりファージベクター (λgt11, ZAP など) を用いた cDNA ライブラリーを作製し、これを LB-アガロース上で発現させフィルターに発現させた蛋白質を固定し、精製して標識した本発明の蛋白質と上記フィルターとを反応させ、本発明の蛋白質と結合した蛋白質を発現するブランクを標識により検出すればよい。本発明の蛋白質を標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性を利用する方法、本発明の蛋白質又は本発明の蛋白質に融合したペプチド又はポリペプチド (例えば GST など) に特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法又は蛍光を利用する方法等が挙げられる。

また、本発明のスクリーニング方法の他の態様としては、細胞を用いた 2-ハイブリッドシステム (Fields, S., and Sternglanz, R., Trends. Genet. (1994) 10, 286-292, Dalton S, and Treisman R (1992) Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612, 「MATCHMARKER Two-Hybrid System」, 「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」, 「MATCHMAKER One-Hybrid System」 (いずれもクロンテック社製)、 「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」 (ストラタジーン社製)) を用いて行う方法が挙げられる。2-ハイブリッドシステムにおいては、本発明の蛋白質またはその部分ペプチドを SRF DNA 結合領域または GAL4 DNA 結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、本発明の蛋白質と

結合する蛋白質を発現していることが予想される細胞より、VP16 または GAL4 転写活性化領域と融合する形で発現するような cDNA ライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリー由来 cDNA を単離する（酵母細胞内で本発明の蛋白質と結合する蛋白質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローンが確認できる）。単離した cDNA を大腸菌に導入して発現させることにより、該 cDNA がコードする蛋白質を得ることができる。これにより本発明の蛋白質に結合する蛋白質またはその遺伝子を調製することが可能である。2-ハイブリッドシステムにおいて用いられるレポーター遺伝子としては、例えば、HIS3 遺伝子の他、Ade2 遺伝子、LacZ 遺伝子、CAT 遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor type1) 遺伝子等が挙げられるが、これらに制限されない。2 ハイブリッド法によるスクリーニングは、酵母の他、哺乳動物細胞などを使って行うこともできる。

本発明の蛋白質と結合する化合物のスクリーニングは、アフィニティークロマトグラフィーを用いて行うこともできる。例えば、本発明の蛋白質をアフィニティークラムの担体に固定し、ここに本発明の蛋白質と結合する蛋白質を発現していることが予想される被検試料を適用する。この場合の被検試料としては、例えば細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被検試料を適用した後、カラムを洗浄し、本発明の蛋白質に結合した蛋白質を調製することができる。

得られた蛋白質は、そのアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴ DNA を合成し、該 DNA をプローブとして cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、該蛋白質をコードする DNA を得ることができる。

本発明において、結合した化合物を検出又は測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することもできる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは、本発明の蛋白質と被検化合物との間の相互作用を微量の蛋白質を用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグ

ナルとしてリアルタイムに観察することが可能である（例えば BIAcore、Pharmacia 製）。したがって、BIAcore 等のバイオセンサーを用いることにより本発明の蛋白質と被検化合物との結合を評価することが可能である。

また、蛋白質に限らず、本発明の蛋白質に結合する化合物（アゴニストおよびアンタゴニストを含む）を単離する方法としては、例えば、固定した本発明の蛋白質に、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、本発明の蛋白質に結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニング方法（Wrighton NC; Farrell FX; Chang R; Kashyap AK; Barbone FP; Mulcahy LS; Johnson DL; Barrett RW; Jolliffe LK; Dower WJ., Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 p458-64, Verdine GL., The combinatorial chemistry of nature. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p11-13, Hogan JC Jr., Directed combinatorial chemistry. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p17-9) が当業者に公知である。

本発明のスクリーニングにより単離しうる化合物は、本発明の蛋白質の活性を調節するための薬剤の候補となり、本発明の蛋白質の発現異常や機能異常などに起因する疾患や本発明の蛋白質の活性を制御することにより治療可能な疾患の治療への応用が考えられる。本発明のスクリーニング方法を用いて単離しうる化合物の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される物質も、本発明の蛋白質に結合する化合物に含まれる。

本発明の蛋白質、または本発明のスクリーニングにより単離しうる化合物をヒトや哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントヒヒ、チンパンジーの医薬として使用する場合には、蛋白質や単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、必要

に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート 80 (TM)、HCO-50 と併用してもよい。

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例え

ばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、経皮的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

本発明の蛋白質の投与量は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約100 μ gから20mgであると考えられる。

本発明の蛋白質と結合する化合物や本発明の蛋白質の活性を調節する化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgであると考えられる。

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、通常、1日当たり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好ましくは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合であると考えられる。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量、あるいは体表面積あたりに換算した量を投与することができる。

図面の簡単な説明

図1は、3T3-L1細胞における本発明の遺伝子の発現をノザンプロット解析により検出した結果を示す電気泳動写真である。レーン1は増殖しつつある3T3-L1細胞、レーン2はコンフルエント3T3-L1細胞、レーン3は脂肪細胞に分化誘導した3T3-L1細胞である。

図2は、種々の組織における本発明の遺伝子の発現をノザンプロット解析により検出した結果を示す電気泳動写真である。レーンはそれぞれ、1：心臓、2：脳、3：脾臓、4：肺、5：肝臓、6：骨格筋、7：腎臓、8：精巣、である。

図3は、対数期(log phase)の3T3-L1、コンフルエント状態の3T3-L1、脂肪細胞に分化誘導後1から9日目の3T3-L1における#103から#106およびGAPDHの発現を、ノザンプロット解析により検出した結果を示す電気泳動写真である。

図4は、インスリンを0nM(対照：MOCK)、25nM、250nM加えた脂肪細胞における#105およびGAPDHの発現を、ノザンプロット解析により検出した結果を示す電気泳動写真である。

図5は、様々な癌細胞株、脂肪細胞および3T3-L1における#104の発現を、ノザンプロット解析により検出した結果を示す電気泳動写真である。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1] cDNAライブラリの構築およびスクリーニング

レトロウイルスベクターpMX-SST (Kojima, T. and Kitamura, T. (1999) Nature Biotechnol. 17, 487-490) を用いて、cDNAライブラリ構築および発現を行なった。

ファスト・トラック 2.0 mRNA単離キット(インビトロゲン社、カリフォルニア州カールスバッド)を用いて、製造元のプロトコールに従って、分化した3T3-L1細胞から抽出した。

スーパースクリプト・チョイス・システム（ギブコ-BRL 社、ロックビル、メリーランド州、アメリカ）を用いて、相補的 DNA（cDNA）をランダム 6 量体によってポリ(A)⁺RNA から合成し、BstXI アダプターを用いて pMX-SST ベクターの BstXI 部位に挿入した（インビトロゲン社、カールスバッド、カリフォルニア州）。SST-REX ライブラリを構築するために、ライゲーションした DNA を DH10B 細胞に増幅して（エレクトロマックス、ギブコ-BRL 社）、キアゲン・プラスミドキット（キアゲン・インク、バレンシア、カリフォルニア州）を用いてライブラリ DNA を調製した。

SST-REX ライブラリを提示する高力価レトロウイルスを、パッケージングした細胞株 BOSC23 (Pear, W.S. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 839 2-8396) を用いて産生し、記述のように Ba/F3 細胞に感染させた。1 日感染させた後細胞を 3 回洗浄し、96 ウェルマルチタイタープレート (10^3 個/ウェル) を用いて IL-3 の非存在下でクローンを選択した。

12 日後、ゲノム DNA を因子非依存的 Ba/F3 クローンから抽出し、ゲノム PCR に供し、ベクタープライマーを用いて、組み入れられた cDNA を回収した (GGGG GTGGACCATCCTCTA/配列番号: 12、および CGCGCAGCTGTAAACGGTAG/配列番号: 13)。ジーンアンプ PCR システム 2400 (パーキン・エルマー、ノーウオーク、コネチカット州) および LA Taq ポリメラーゼ (タカラ、京都、日本) を用いて、PCR を 30 サイクル (98°C で変性 20 秒、68°C でアニーリングおよび伸長 2 分) 行った。得られた PCR 断片を、Taq ダイターミネーター・サイクルシーケンシングキット (アプライド・バイオシステムズ・インク、フォスターシティ、カリフォルニア州) を用いてシーケンシングして、自動シーケンサー (310 遺伝子アナライザー、アプライド・バイオシステムズ・インク) によって分析した。

本発明者等は、クローン 9×10^5 個をスクリーニングした。全体でウェル 1152 個中 71 ウェルにおいて増殖しつつある細胞は単一の PCR バンドを生じ、これをさらなる分析に供した。

なお、実験に用いた分化した 3T3-L1 細胞は、以下のようにして調製した。3T3-L1 細胞を、10%FCS、50 単位/ml ペニシリン、および 50 μ g/ml ストレプトマイシンを含む DMEM (DMEM-FCS) 中で 5 %CO₂において 37°Cで培養した。細胞をコンフルエントになるまで増殖させ、2日間維持した。分化を誘導するために、培地を 0.5mM 1-メチル-3-イソブチルキサンチン、0.25 μ M デキサメタゾン、および 10 μ g/ml インスリンを含む DMEM-FCS に交換した。2日後、培地を DMEM-FCS に交換して、細胞を分化させた。マウス IL-3 依存的前 B 細胞株である Ba/F3 を 10%FCS および 2 ng/ml マウス IL-3 (R&D システムズ) を含む RPMI 1640 培地で培養した。

〔実施例 2〕 単離された cDNA クローンの分析

組み込み体 71 個中 63 個は、既知の蛋白質 28 個に関する cDNA の 5' 配列を含み、それらの全てはシグナル配列を含んでいた (表 1)。

表1

No.	同一性	クローン数
分泌タンパク質		(全) 50
細胞外マトリックスおよび関連タンパク質		(全) 28
1	Procollagen alpha-2(I)	5
2	Collagen alpha-1 (III)	2
3	Collagen alpha-1 (VI)	2
4	Collagen alpha-2 (IV)	2
5	Collagen alpha-1 (IV)	1
6	Collagen alpha-1 (XV)	1
7	Procollagen C-proteinase enhancer protein	3
8	Cysteine-rich glycoprotein SPARC	4
9	Extracellular matrix associated protein (Sc1)	3
10	Entactin (ENT)	2
11	Fibulin-2	1
12	Lysyl oxidase	1
13	Dystroglycan (DAG1)	1
その他の分泌タンパク質		(全) 22
14	Adipocyte complement-related protein of 30kDa (Acrp30)	10
15	Sulfated glycoprotein (Sgp1)	4
16	Lipoprotein lipase	2
17	Cystatin C	2
18	FK506-binding protein (FKBP23)	1
19	Epithelin	1
20	Disulfide isomerase-related protein (ERp72)	1
21	Interferon receptor soluble isoform (IFNAR2)	1
膜タンパク質		(全) 13
22	Amyloid precursor-like protein 2 (APLP2)	4
23	Amyloid beta protein precursor	1
24	Syndecan-1	3
25	Lysosomal membrane glycoprotein-typeA	2
26	Rat ribophorin I homologue	1
27	Tissue factor Cf-3	1
28	Putative transmembrane receptor (frizzled 7)	1
		(全) 63

同定された蛋白質 63 個中、50 個 (79%) が分泌型蛋白質であり、分泌型蛋白質 50 個中 28 個が細胞外マトリックス (ECM) 蛋白質または関連蛋白質であった。

13個は膜蛋白質であった。残りの8クローンはシグナルペプチドを有する独立した新規蛋白質7個を表した(表2)。

表2

クローン	類似性	クローン数
101	No similarity to database sequences	1
102	No similarity to database sequences	1
103	No similarity to database sequences	1
104	No similarity to database sequences	1
105	Cell surface protein MCAR	1
106	Collagen alpha 1(XI)	2
107	No similarity to database sequences	1

蛋白質5個は既知の蛋白質との類似性を示さなかった。1つは細胞表面蛋白質MCAR(マウスコクサッキーウイルスおよびアデノウイルス受容体)(Bergelson, J.M. et al.(1998) J.Virol. 72, 415-419)と類似であり、もう一つはコラーゲン類と類似性があった。

[実施例3] 分化の際の新規脂肪細胞遺伝子の発現

ノザンプロット分析によって、分化の際のクローン#101-107を含む新規遺伝子7個の発現パターンを調べた(図1)。ポリ(A)⁺RNAは、実施例1と同様の手法で、増殖しつつある3T3-L1細胞、コンフルエント3T3-L1細胞、および脂肪細胞に分化誘導した3T3-L1細胞から調製した。

ポリ(A)⁺RNA 1 μ gを、2%ホルムアルデヒドを含む1.0%アガロース・ゲル上で電気泳動して、その後ハイボンド-N-ナイロンメンブレン(アマシャム・ファルマシア・バイオテック(株))に移した。メンブレンをハイブリダイゼーション緩衝液(50%ホルムアミド、10×デンハート試薬、5×SSC、0.1%SDS、200 μ g/ml 変性サケ精子DNA)中、42°Cで因子依存的クローンに由来する³²P-標識DNA断片をプローブとして調べた。各レーンにおけるRNA量を評価するために、ローディング対照としてメンブレンの1つをマウスリン酸グルタルアルデヒドデ

ヒドロゲナーゼ (GAPDH) に対する cDNA をプローブとして調べた。ハイブリダイゼーション後、フィルターを 0.1×SSC、0.1%SDS 中で 42°C で洗浄して、オートラジオグラフィーを行った。

その結果、mRNA の発現は、クローン#102 を除く全てのクローンでは分化と共に変化した。クローン#101、#104、#106、および#107 の mRNA は分化後増加した。クローン#105 は 2 つのバンドを示した。細胞が脂肪細胞に分化すると、低分子量 mRNA は著しく発現された。クローン#103 の場合、mRNA の増加に関して十分であったのは、3T3-L1 細胞がコンフルエンスになるまで増殖することのみであった。

〔実施例 4〕 多マウス組織のノザンブロット分析

新規脂肪細胞由来遺伝子の多マウス組織での発現プロファイルをノザンブロット分析により調べた (図 2)。マウス多組織ノザンブロットをクロンテック社 (パロアルト、カリフォルニア州) から購入した。実施例 3 において、発現が脂肪細胞において有意に増加していることが示された、クローン#102 を除く遺伝子 6 個を選択し、検討した。

その結果、クローン#101 の発現は精巣において極めて高いが、mRNA は心臓、脾臓、および肝臓での検出は弱かった。クローン#103 は、心臓および肺において特異的に発現されたが、精巣では低分子量のバンドの検出は弱かった。クローン#104 の発現は心臓および肝臓において極めて高いが、脳、肺および腎臓における mRNA の検出は弱かった。クローン#105 は心臓および脳に限って転写された。脳では高分子量バンドのみが検出されたことは注目に値する。クローン#106 の発現は心臓のみに検出された。心臓、肝臓、腎臓および精巣におけるクローン#107 mRNA レベルはその他より高かった。このように、新規脂肪細胞由来遺伝子の組織での発現には顕著な差が存在することが判明した。

〔実施例 5〕 mRNA の経日的変化

通常の方法により、ノザンプロット分析（を行った。各レーンのサンプルはそれぞれ、対数期（log phase）の 3T3-L1、コンフルエント状態の 3T3-L1、脂肪細胞に分化誘導後 1 から 9 日目の 3T3-L1 である。#103 から #106、GAPDH をプローブとした。

その結果、図 3 に示すように、#103 では興味深いことに、コンフルエントで発現量が上昇するが、分化誘導開始後初期の 1 から 3 日目までは発現量が減少し、ほとんど見られないが、4 日目以降再び発現量が上昇した。#105 では、分化誘導後 2 日目までは高分子量のバンドが見られるが、3 日目からは低分子量のバンドのみが見られた。#104 と #106 では分化誘導後 6 日目までは強い発現が認められるが、7 日目以降は発現量が減少した。

【実施例 6】 インスリン (insulin) 添加による効果

通常の方法により、ノザンプロット分析を行った。各レーンのサンプルはそれぞれ、対照の脂肪細胞、25nM、250nM のインスリンを加えた脂肪細胞である。#105、GAPDH をプローブとした。

その結果、図 4 に示すように、250nM のインスリンを加えた脂肪細胞では #105 の発現は抑制された。

【実施例 7】 癌細胞株における #104 の発現

通常の方法により、ノザンプロット分析を行った。各レーンのサンプルは、それぞれ図 5 に示した細胞株を使用した。#104 をプローブとした。

その結果、図 5 の通り癌細胞株 (cancer cell line) では種類によって低分子量のバンドの発現が見られるものと見られないものがあった。

産業上の利用の可能性

本発明により脂肪細胞に由来し、シグナル配列を有する新規な蛋白質をコードする遺伝子が提供された。これら遺伝子は、その発現特性から、脂肪細胞の分化に関わる重要な分子である可能性がある。本発明の蛋白質は、医薬品開発の標的

として有用であり、また、本発明の蛋白質の機能を調節する化合物は、医薬品としての応用が期待される。

請求の範囲

1. 下記 (a) から (f) のいずれかに記載の DNA。

(a) 配列番号：8～11 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードする DNA。

(b) 配列番号：1～7 のいずれかに記載の塩基配列のコード領域を含む DNA。

(c) 配列番号：8～11 のいずれかに記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：8～11 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA。

(d) 配列番号：1、2、7 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA に対応する全長 DNA によりコードされる蛋白質のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、該全長 DNA によりコードされる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA。

(e) 配列番号：3～6 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、配列番号：8～11 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA。

(f) 配列番号：1、2、7 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、これら DNA に対応する全長 DNA によりコードされる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードする DNA。

2. 配列番号：8～11 のいずれかに記載のアミノ酸配列からなる蛋白質の部分ペプチドをコードする DNA。

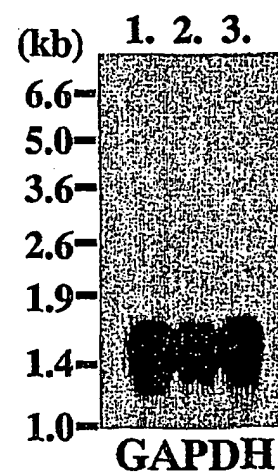
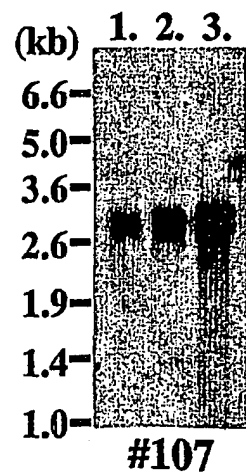
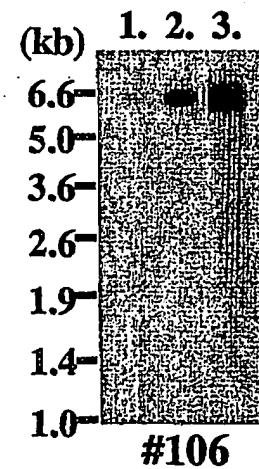
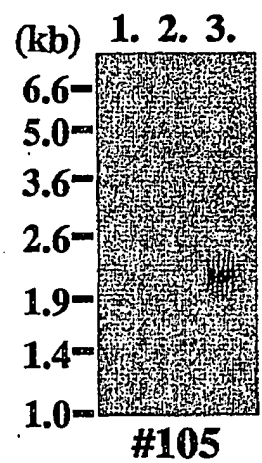
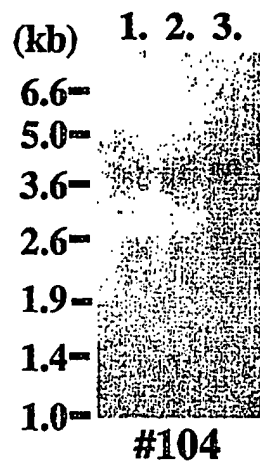
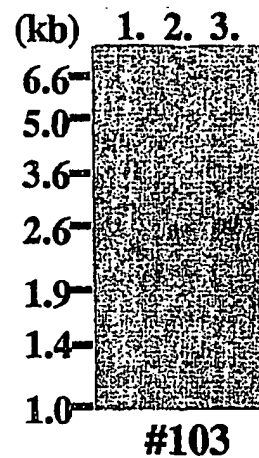
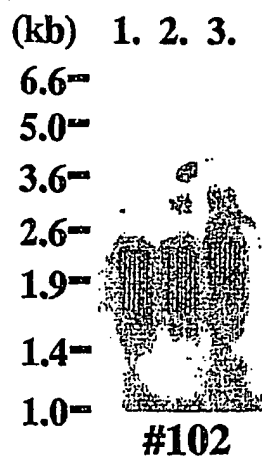
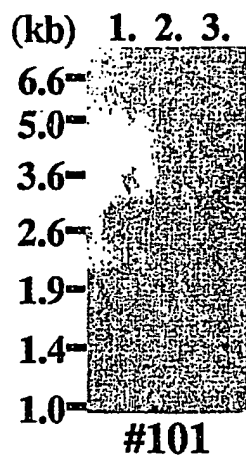
3. 請求項1または2に記載の DNA によりコードされる蛋白質またはペプチド。

4. 請求項1または2に記載の DNA が挿入されたベクター。

5. 請求項 1 または 2 に記載の DNA または請求項 4 に記載のベクターを保持する宿主細胞。
6. 請求項 5 に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から発現させた蛋白質を回収する工程を含む、請求項 3 に記載の蛋白質またはペプチドの製造方法。
7. 請求項 3 に記載の蛋白質に結合する抗体。
8. 配列番号：1～7 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチド。
9. 請求項 3 に記載の蛋白質に結合する化合物のスクリーニング方法であって、
 - (a) 該蛋白質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、
 - (b) 該蛋白質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、
 - (c) 該蛋白質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

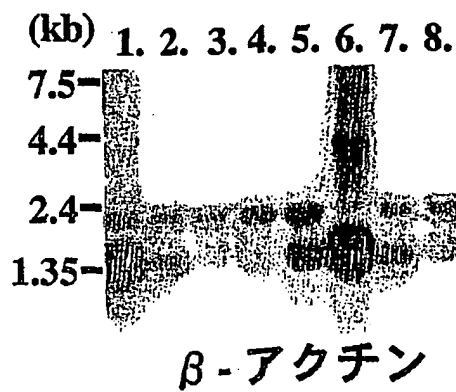
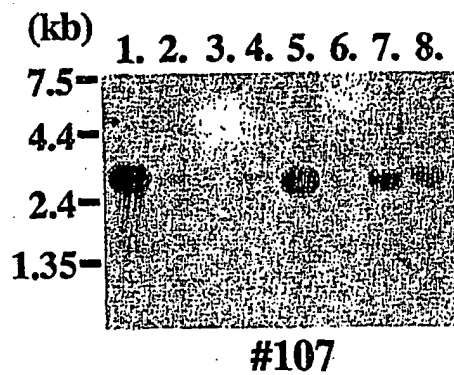
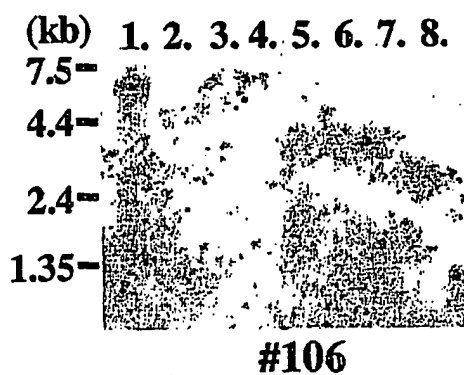
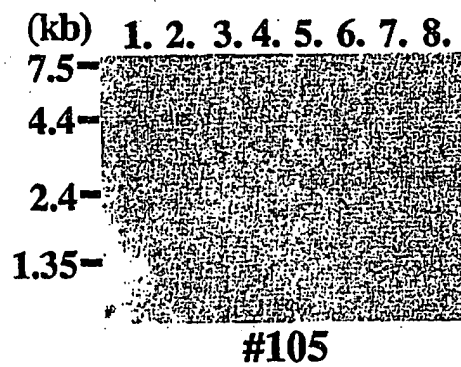
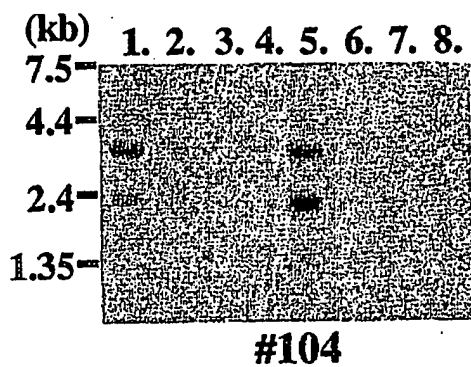
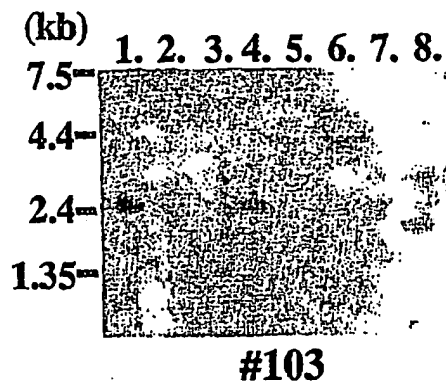
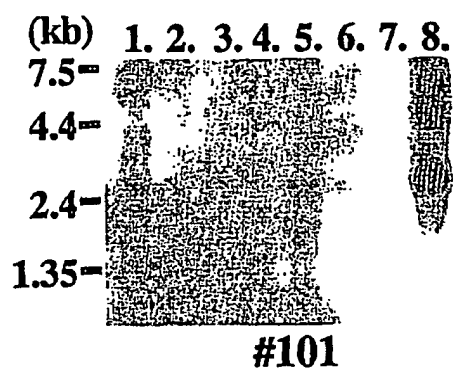
1/5

図 1



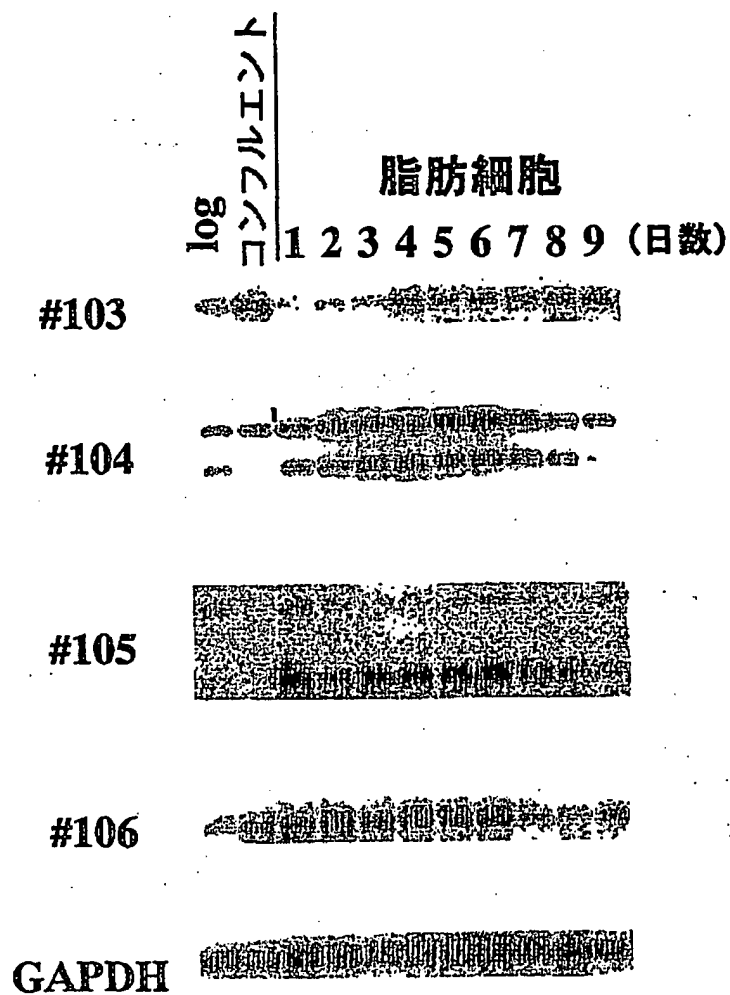
2 / 5

図 2



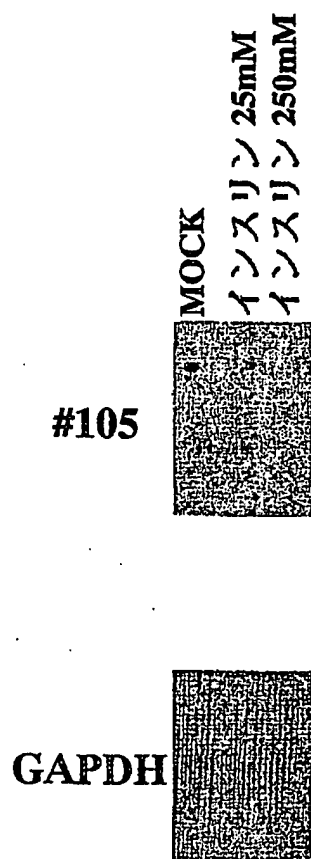
3/5

图 3



4 / 5

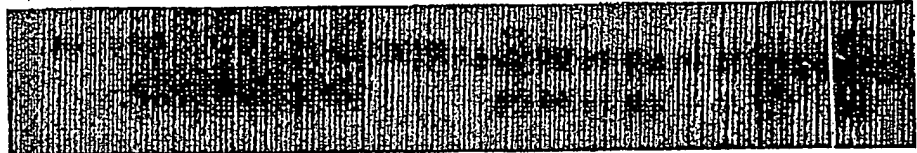
図 4



5 / 5

☒ 5

NIH3T3
NRK
Ras
F1 wild
F1
F10
Colon 26 P
Colon 26 #20
Colon 26 #5
AT 2
AT 3.1
AT 6.3
LLC
ML-01
MH-02
Y-5178
ML-25
293
P19
YPEN-1
Hep-2
3T3-L1



1 / 5 1

SEQUENCE LISTING

<110> Toshio KITAMURA

<120> The genes derived from murine adipocytes.

<130> C1-A0005P

<140>

<141>

<150> JP 2000-72502

<151> 2000-03-10

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 165

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

ccaccctcca gctacatgac ggggatgtcc gccaccagct cctacatgtc aggagagggc 60
tatcagagcc tgcagtccat gatgaagacg gagggcccct cctatggtgc cacttcccc 120

2 / 5 1

agcgtactga gccacactgc tcacctactt tccagcacag tggcg

165

<210> 2

<211> 438

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

ggtagcatcc agaaggatct aggtttttct tgcgggcttg ggccccaatg tattgtgggg 60
attgtagttc tagaacctgt atcgttggt ctatggagca tcttctcag tcgtttctct 120
ccttggttaa aatctggaca atctgcatgg gtgggggtga atactcattc cttataggca 180
tactgagccc cgccttgga gagacgtct taaattacag gcctgatggc cccctttagg 240
ggttttaag gtgagtaagt cccagctga agttcataaa gagaagatga agacaccaca 300
ccacttagaa gttgcccatc ggtgtgagac ttgctgatg ggggtctact gtagggattt 360
tacaacaagc agcatgccct cccccaacc accctccca tccccaacag ggaggaagcc 420
aggtctttcc agcacagt 438

<210> 3

<211> 2192

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

3/51

<222> (83)..(1408)

<400> 3

gggtgctggc agggagaggg ggtcggctgt ttttctggag agttagagct gagtaagaca 60

aagcacgtcc cccgcaggcg cc atg gaa ctg ctg tcc cgt gtc ctg ctg tgg 112

Met Glu Leu Leu Ser Arg Val Leu Leu Trp

1

5

10

aaa ctg ctg ctt ctt cag agc tct gca gtc ctg tcc tca ggg cct tca 160

Lys Leu Leu Leu Leu Gln Ser Ser Ala Val Leu Ser Ser Gly Pro Ser

15

20

25

ggg acc gca gca gcc agc aac tct ctg gtg tct gag tct gtg gtg agc 208

Gly Thr Ala Ala Ala Ser Asn Ser Leu Val Ser Glu Ser Val Val Ser

30

35

40

ttg gca gcc gga acc cag gct gtg cta cgc tgc cag agc ccc cgc atg 256

Leu Ala Ala Gly Thr Gln Ala Val Leu Arg Cys Gln Ser Pro Arg Met

45

50

55

gtg tgg acc caa gac cgg ctg cat gat cgc cag cgc gtg gtc cac tgg 304

Val Trp Thr Gln Asp Arg Leu His Asp Arg Gln Arg Val Val His Trp

60

65

70

gac ctc agc ggg ggc ccg ggc agc caa cgg cgc cga ctt gtg gat atg 352

4/5 1

Asp Leu Ser Gly Gly Pro Gly Ser Gln Arg Arg Arg Leu Val Asp Met

75 80 85 90

tat tgc ggc ggt gaa cag cgc gtg tac gag ccg cgc gat cgc gac cgc 400

Tyr Ser Ala Gly Glu Gln Arg Val Tyr Glu Pro Arg Asp Arg Asp Arg

95 100 105

ctc ctg ctg tgc cct tct gct ttc cac gac ggc aac ttc tgc ctg ctc 448

Leu Leu Leu Ser Pro Ser Ala Phe His Asp Gly Asn Phe Ser Leu Leu

110 115 120

att cgc gct gtg gag aga ggc gat gaa ggg gtg tac acc tgc aac ctg 496

Ile Arg Ala Val Glu Arg Gly Asp Glu Gly Val Tyr Thr Cys Asn Leu

125 130 135

cac cat cac tac tgc cac ctc gat gag agc ctg gct gtg cgc ctc gag 544

His His His Tyr Cys His Leu Asp Glu Ser Leu Ala Val Arg Leu Glu

140 145 150

gtt aca gag gat ccc cta tta agt cgc gca tac tgg gac ggt gag aag 592

Val Thr Glu Asp Pro Leu Leu Ser Arg Ala Tyr Trp Asp Gly Glu Lys

155 160 165 170

gaa gtg ttg gtg gtg gcc cat ggc gcg ccg gca ctg atg acc tgc atc 640

Glu Val Leu Val Val Ala His Gly Ala Pro Ala Leu Met Thr Cys Ile

175 180 185

5 / 5 1

aac cgt gcg cac gtg tgg act gac cgc cat tta gag gag gcg cag cag 688
 Asn Arg Ala His Val Trp Thr Asp Arg His Leu Glu Glu Ala Gln Gln
 190 195 200

gtg gtc cat tgg gac cga cag cta cct gga gtg tca cac gac cgc gcc 736
 Val Val His Trp Asp Arg Gln Leu Pro Gly Val Ser His Asp Arg Ala
 205 210 215

gac cgc ctg ctt gac ctg tat gca tct ggc gag cgc cgc gcc tat ggg 784
 Asp Arg Leu Leu Asp Leu Tyr Ala Ser Gly Glu Arg Arg Ala Tyr Gly
 220 225 230

ccg ccc ttc ctg cgt gat cgc gtg tca gtg aac acc aac gct ttt gca 832
 Pro Pro Phe Leu Arg Asp Arg Val Ser Val Asn Thr Asn Ala Phe Ala
 235 240 245 250

cgc ggt gac ttc tcc cta cgc atc gat gag ctg gag cga gct gat gag 880
 Arg Gly Asp Phe Ser Leu Arg Ile Asp Glu Leu Glu Arg Ala Asp Glu
 255 260 265

ggc atc tat tcc tgc cac ctg cac cat cac tac tgt ggc ctc cac gag 928
 Gly Ile Tyr Ser Cys His Leu His His His Tyr Cys Gly Leu His Glu
 270 275 280

cgc cga gtc ttc cac cta cag gtc aca gag cct gcc ttt gag cca cca 976

6 / 5 1

Arg Arg Val Phe His Leu Gln Val Thr Glu Pro Ala Phe Glu Pro Pro

285

290

295

gct cgt gct tct cct ggc aat ggg tct ggt cac agc agt gct cct agc 1024

Ala Arg Ala Ser Pro Gly Asn Gly Ser Gly His Ser Ser Ala Pro Ser

300

305

310

cca gat ccc acc ctg acc cga ggc cac agc atc atc aat gtc att gtc 1072

Pro Asp Pro Thr Leu Thr Arg Gly His Ser Ile Ile Asn Val Ile Val

315

320

325

330

cca gag gac cac aca cat ttc ttc cag caa ctg ggc tac gtg ttg gcc 1120

Pro Glu Asp His Thr His Phe Phe Gln Gln Leu Gly Tyr Val Leu Ala

335

340

345

acg ctg ctg ctc ttc atc ttg ctg ctc atc act gta gtc ctg gct aca 1168

Thr Leu Leu Leu Phe Ile Leu Leu Leu Ile Thr Val Val Leu Ala Thr

350

355

360

cga cat cgt cac agc gga gga tgc aag acg tcg gac aaa aaa gct ggg 1216

Arg His Arg His Ser Gly Gly Cys Lys Thr Ser Asp Lys Lys Ala Gly

365

370

375

aag tca aag ggg aag gat gtg aac atg gtg gag ttt gct gta gcc aca 1264

Lys Ser Lys Gly Lys Asp Val Asn Met Val Glu Phe Ala Val Ala Thr

380

385

390

7/51

agg gat cag gct cca tat agg act gag gac atc cag cta gat tac aaa 1312
 Arg Asp Gln Ala Pro Tyr Arg Thr Glu Asp Ile Gln Leu Asp Tyr Lys
 395 400 405 410

aac aac atc ctg aag gag agg gct gag ctg gcc cat agt cct ctg cct 1360
 Asn Asn Ile Leu Lys Glu Arg Ala Glu Leu Ala His Ser Pro Leu Pro
 415 420 425

gcc aag gat gtg gat ctg gat aaa gag ttc agg aag gag tac tgc aaa 1408
 Ala Lys Asp Val Asp Leu Asp Lys Glu Phe Arg Lys Glu Tyr Cys Lys
 430 435 440

taaatggacc ctgagcttct ggctgggcca gcagctctgt atcaaaggac atctccctga 1468

ccctctgcg gtattcttg ctcttctcag cggttggtcc gacttaccta gaaacttggc 1528

ctaaacttgg cagagcagct gctgtactt tgccttctc agaatgccca cccctcatct 1588

tggtgagcaa ctgtgggttc cctagagact ctggtatagt acgattgctg cccttcagtc 1648

acctgtgccc actgatggtc gtacccccaa cttaaacaca acaaagatcc ctgtttaata 1708

tccaccaa at gcaaagtc tctgtggcctc ttactgctag ggtcaggaag acacttaaaa 1768

attccagta agactcccta gccaccagtt aaacacatta gccattgtcc tggggggggg 1828

8 / 5 1

tcttcctgag ctgcatcgtg cctgtgtact gtcagagcc ctgctgttat aggttctgac 1888

tcattggccc gccttgctgc ttgggcaac ttgaggctag cccaggccc tttctctgct 1948

tctgattcct ttctgccccaa tgcctcccaa gagctacacc agcagttact ggtaccgta 2008

tgacccttgg ccttgacatc cctccctagg ctggagtctg gggttggggc cccattgtc 2068

ctctgttttg gctgaagatg gggtaagat ttggctgagt ggctatgct gtcacatcaa 2128

acagctatca tttactccta cttgggaagt tttcatgtga caataaaaga tacatctgac 2188

tttt

2192

<210> 4

<211> 2116

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (214)..(1662)

<400> 4

9 / 5 1

acgcattcta cgtaacggac ggctgaagct acgtgaagag tagggtgccg tgactgagct 60

acctgttctg ggctgttcag tgacatcgcg gcccgagat tatctttgcg acctgaagac 120

agaaaccaga caaaggcagg ctggttgag gtagtggcct caggagcccc gggcccgtt 180

gcagcctcgg gtgcagcttg tttttaaggt gca atg aaa gcc ttc tat gct ttc 234

Met Lys Ala Phe Tyr Ala Phe

1

5

tgt gtg gtc ctc ttg gtg ttt ggg agt gtc tcg gaa gcc aag ttt gat 282

Cys Val Val Leu Leu Val Phe Gly Ser Val Ser Glu Ala Lys Phe Asp

10

15

20

gat ttc gaa gat gag gaa gac ata gta gag tat gat gat aat gat ttt 330

Asp Phe Glu Asp Glu Glu Asp Ile Val Glu Tyr Asp Asp Asn Asp Phe

25

30

35

gct gag ttt gag gac gtc atg gaa gat tct gtt acg gag tcg cct cag 378

Ala Glu Phe Glu Asp Val Met Glu Asp Ser Val Thr Glu Ser Pro Gln

40

45

50

55

cga gtg atc agc act gaa gat gac gag gac gag gcc acc gtg gag ttg 426

Arg Val Ile Ser Thr Glu Asp Asp Glu Asp Glu Ala Thr Val Glu Leu

60

65

70

10/51

gaa ggg cag gat gaa agc caa gaa ggt gat ttc gaa gat gca gat acc 474

Glu Gly Gln Asp Glu Ser Gln Glu Gly Asp Phe Glu Asp Ala Asp Thr

75

80

85

cag gag gga gat aca gaa agt gag cca tat gat gat gag gaa ttt gag 522

Gln Glu Gly Asp Thr Glu Ser Glu Pro Tyr Asp Asp Glu Glu Phe Glu

90

95

100

ggt tat gaa gac aaa cca gat acc tct tct aac aaa aat aaa gat cca 570

Gly Tyr Glu Asp Lys Pro Asp Thr Ser Ser Asn Lys Asn Lys Asp Pro

105

110

115

ata aca att gtt gat gtt cct gca cac ctc cag aac agt tgg gag agt 618

Ile Thr Ile Val Asp Val Pro Ala His Leu Gln Asn Ser Trp Glu Ser

120

125

130

135

tat tac cta gaa att ttg atg gtg act ggt ctg ctt gcc tat atc atg 666

Tyr Tyr Leu Glu Ile Leu Met Val Thr Gly Leu Leu Ala Tyr Ile Met

140

145

150

aac tac atc att ggg aag aat aaa aac agc cga ctt gct cag gcc tgg 714

Asn Tyr Ile Ile Gly Lys Asn Lys Asn Ser Arg Leu Ala Gln Ala Trp

155

160

165

ttt aac tct cat aga gag ctt ttg gag agc aat ttt aca tta gtg ggg 762

Phe Asn Ser His Arg Glu Leu Leu Glu Ser Asn Phe Thr Leu Val Gly

11/51

170

175

180

gat gat ggg act aac aaa gaa gcc aca agc aca ggg aag ttg aat cag 810

Asp Asp Gly Thr Asn Lys Glu Ala Thr Ser Thr Gly Lys Leu Asn Gln

185

190

195

gag aat gag cac atc tat aac ctg tgg tgt tct ggc cga gtg tgc tgt 858

Glu Asn Glu His Ile Tyr Asn Leu Trp Cys Ser Gly Arg Val Cys Cys

200

205

210

215

gaa ggc atg ctt atc cag ctg agg ttc ctt aag aga caa gac tta ctt 906

Glu Gly Met Leu Ile Gln Leu Arg Phe Leu Lys Arg Gln Asp Leu Leu

220

225

230

aat gtc ctg gcc cgg atg atg agg cca gtg agt gat caa gtg caa ata 954

Asn Val Leu Ala Arg Met Met Arg Pro Val Ser Asp Gln Val Gln Ile

235

240

245

aaa gta aca atg aat gac gag gac atg gac aca tac gtg ttt gct gtc 1002

Lys Val Thr Met Asn Asp Glu Asp Met Asp Thr Tyr Val Phe Ala Val

250

255

260

ggc act cgc aaa gct ttg ctg cga cta cag aaa gag atg cag gat ctg 1050

Gly Thr Arg Lys Ala Leu Leu Arg Leu Gln Lys Glu Met Gln Asp Leu

265

270

275

1 2 / 5 1

agt gag ttt tgc agt gat aaa cca aag tct gga gca aag tat gga ctg 1098

Ser Glu Phe Cys Ser Asp Lys Pro Lys Ser Gly Ala Lys Tyr Gly Leu

280 285 290 295

cca gac tct ttg gcc att ctg tca gaa atg gga gaa gtc aca gag gga 1146

Pro Asp Ser Leu Ala Ile Leu Ser Glu Met Gly Glu Val Thr Glu Gly

300 305 310

atg atg gat aca aag atg gtt cat ttt ctt aca cac tat gct gat aag 1194

Met Met Asp Thr Lys Met Val His Phe Leu Thr His Tyr Ala Asp Lys

315 320 325

att gaa tct gtt cat ttt tca gac cag ttc tct ggt cca aag att atg 1242

Ile Glu Ser Val His Phe Ser Asp Gln Phe Ser Gly Pro Lys Ile Met

330 335 340

caa gag gaa ggc cag cct tta aag ctg cct gac acc aag agg acg cta 1290

Gln Glu Glu Gly Gln Pro Leu Lys Leu Pro Asp Thr Lys Arg Thr Leu

345 350 355

ctg ttt aca ttt aat gtg cct ggc tca ggt aac aca tac cca aag gat 1338

Leu Phe Thr Phe Asn Val Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Pro Lys Asp

360 365 370 375

atg gag tct ttg cta ccc ctg atg aac atg gtg att tat tct atc gat 1386

Met Glu Ser Leu Leu Pro Leu Met Asn Met Val Ile Tyr Ser Ile Asp

1 3 / 5 1

380

385

390

aaa gcc aaa aag ttc cga ctc aac aga gaa ggg aaa caa aaa gca gat 1434

Lys Ala Lys Lys Phe Arg Leu Asn Arg Glu Gly Lys Gln Lys Ala Asp

395

400

405

aag aac cgg gct cgt gtg gaa gag aac ttt ctg aag ctg aca cat gtg 1482

Lys Asn Arg Ala Arg Val Glu Glu Asn Phe Leu Lys Leu Thr His Val

410

415

420

cag aga cag gag gct gca cag tct cgg cgt gag gag aaa aaa aga gct 1530

Gln Arg Gln Glu Ala Ala Gln Ser Arg Arg Glu Glu Lys Lys Arg Ala

425

430

435

gag aag gag cgg atc atg aac gag gag gac cct gag aaa cag cgc agg 1578

Glu Lys Glu Arg Ile Met Asn Glu Glu Asp Pro Glu Lys Gln Arg Arg

440

445

450

455

ctg gaa gaa gct gct ttg agg aga gaa caa aag aag ttg gag aag aag 1626

Leu Glu Glu Ala Ala Leu Arg Arg Glu Gln Lys Lys Leu Glu Lys Lys

460

465

470

caa atg aaa atg aaa caa atc aaa gtg aaa gcc atg tagagctggt 1672

Gln Met Lys Met Lys Gln Ile Lys Val Lys Ala Met

475

480

1 4 / 5 1

tgcagaggtt gtgtccttgc tgccgttagc tctccgtcca ccgagacag gaaaagcagg 1732

agtctgcacc taacagtcac gagtctctgc tgactgagag atctttatct caccctctcc 1792

tctcggttta gaggttctaca gaggttatag atacaatgaa agggctcttt cagttatttc 1852

cttcagata atcaaattat ttgattatt ttataaaagg agcggtatat aaagtatgtg 1912

tagttttaaa atatatTTaa attataatgt gaatcatcag tgcgttactt tgggttttga 1972

agaccgatca tgaaatttct aggtagattg ttgctctttg tttaaactgg acagttgaaa 2032

taactatgga gactgactct aaaccaagac cctaatatct attggaattg cacaataaac 2092

attgcttggt tttctgtgt ccac 2116

<210> 5

<211> 1927

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (289)..(1407)

1 5 / 5 1

<400> 5

gtgttcacg aagcggtagc tccttgccgc ctgccttct cctccctaac cctgggcccg 60

gcccccgctc cgcgcgagc tggtagagcc agggctagaa gccctcgggtg cccccggagc 120

gcagcgcgca ggggacccgg gcgcggggcc agcgcccgca catggctgca gcccccgcg 180

cgacccccaa ggcgccgcgc cctgtcaca gaaggtccgt cggctgggct cggtcgccct 240

gcagccaggc tgcgtgagc cggaagtgc cgtgtccgg agatcggg atg tcc etc 297

Met Ser Leu

1

ttc ttc etc tgg cta gta tcc tat tat gtt gga acg ctg gga act cac 345

Phe Phe Leu Trp Leu Val Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Leu Gly Thr His

5

10

15

act gag atc aag aga gtg gca gag gaa aag gtt acc ttg ccc tgt cac 393

Thr Glu Ile Lys Arg Val Ala Glu Glu Lys Val Thr Leu Pro Cys His

20

25

30

35

cat caa ctg ggg ctt ccc gag aaa gac acc ctg gac att gaa tgg ctg 441

His Gln Leu Gly Leu Pro Glu Lys Asp Thr Leu Asp Ile Glu Trp Leu

40

45

50

etc acc gat aat gaa ggg aac caa aaa gtg gtt att aca tat tcc agc 489

1 6 / 5 1

Leu Thr Asp Asn Glu Gly Asn Gln Lys Val Val Ile Thr Tyr Ser Ser

55

60

65

cgt cat gtc tac aat aac ttg acc gag gag cag aag ggc cga gtg gcc 537

Arg His Val Tyr Asn Asn Leu Thr Glu Glu Gln Lys Gly Arg Val Ala

70

75

80

ttc gct tcc aac ttc ctg gca gga gat gct tcc ctg cag att gag cct 585

Phe Ala Ser Asn Phe Leu Ala Gly Asp Ala Ser Leu Gln Ile Glu Pro

85

90

95

ctg aaa ccc agt gat gaa ggc aga tac acc tgc aag gtg aag aat tca 633

Leu Lys Pro Ser Asp Glu Gly Arg Tyr Thr Cys Lys Val Lys Asn Ser

100

105

110

115

gga cgc tat gtc tgg agc cat gtc atc ttg aaa gcg cta gtg aga cca 681

Gly Arg Tyr Val Trp Ser His Val Ile Leu Lys Ala Leu Val Arg Pro

120

125

130

tcc aag ccc aag tgt gag ctg gaa gga gag ccg acc gaa gga agt gac 729

Ser Lys Pro Lys Cys Glu Leu Glu Gly Glu Pro Thr Glu Gly Ser Asp

135

140

145

ctg acg ctg cag tgt gag tct gcc tct gga act aag ccc att gtg tat 777

Leu Thr Leu Gln Cys Glu Ser Ala Ser Gly Thr Lys Pro Ile Val Tyr

150

155

160

17/51

tat tgg cag cga atc cgg gag aag gag gga gaa gat gaa cac ctg cca 825
Tyr Trp Gln Arg Ile Arg Glu Lys Glu Gly Glu Asp Glu His Leu Pro
165 170 175

ccc aaa tcc aga att gat tac aac aac cct ggc cga gtg ctg ctg cag 873
Pro Lys Ser Arg Ile Asp Tyr Asn Asn Pro Gly Arg Val Leu Leu Gln
180 185 190 195

aat ctc acc atg gcc tcc tct ggg ctt tac cag tgc aca gca ggc aac 921
Asn Leu Thr Met Ala Ser Ser Gly Leu Tyr Gln Cys Thr Ala Gly Asn
200 205 210

gag gct gga aag gag agc tgt gtg gta cgg gtg act gta cag tat gtg 969
Glu Ala Gly Lys Glu Ser Cys Val Val Arg Val Thr Val Gln Tyr Val
215 220 225

cag agc att ggc atg gtg gca gga gca gtg aca ggc ata gtg gca gga 1017
Gln Ser Ile Gly Met Val Ala Gly Ala Val Thr Gly Ile Val Ala Gly
230 235 240

gcc ctg ctc att ttc ctc ctg ata tgg ctg cta ata cga agg aaa agc 1065
Ala Leu Leu Ile Phe Leu Leu Ile Trp Leu Leu Ile Arg Arg Lys Ser
245 250 255

aaa gac aga tac gag gaa gaa gac aga cct aat gaa atc cga gaa gac 1113

18/51

Lys Asp Arg Tyr Glu Glu Glu Asp Arg Pro Asn Glu Ile Arg Glu Asp

260 265 270 275

gct gaa gcg ccc cga gcc cgc ctt gtg aag cct agc tcc tct tcc tca 1161

Ala Glu Ala Pro Arg Ala Arg Leu Val Lys Pro Ser Ser Ser Ser Ser

280 285 290

ggc tcc cgg agc tca cgc tct ggt tcc tcc tcc acc cgc tcc acc ggg 1209

Gly Ser Arg Ser Ser Arg Ser Gly Ser Ser Ser Thr Arg Ser Thr Gly

295 300 305

aac agt gcc tcc aga agc cag cgg acg ctg tcg agt gaa gca gcg ccg 1257

Asn Ser Ala Ser Arg Ser Gln Arg Thr Leu Ser Ser Glu Ala Ala Pro

310 315 320

cag cag ccc ggg cta gcc ccg cag gca tac agc ctc ata gga ccg gaa 1305

Gln Gln Pro Gly Leu Ala Pro Gln Ala Tyr Ser Leu Ile Gly Pro Glu

325 330 335

gtg aga ggt tct gaa cca aag aaa gtc cac cat acg acc ctg acc aaa 1353

Val Arg Gly Ser Glu Pro Lys Lys Val His His Thr Thr Leu Thr Lys

340 345 350 355

gca gaa acc aca ctc agc aca acg ccc agc cag agc aaa gcc ttc caa 1401

Ala Glu Thr Thr Leu Ser Thr Thr Pro Ser Gln Ser Lys Ala Phe Gln

360 365 370

19/51

act gtc tgacttagag tggacttgac ttgtgcttgc cccaaagtca ggatcttagc 1457

Thr Val

ctagtcactg gagctcgtcc accagccacg caagccctc agccagataa cgatctcact 1517

taagtagctg cagaaatggc acggaccagt tctgatgagt accctcctta tataggatac 1577

caaacaaaca caaggacgga ggctgaccat ctatctctaa aggcacctca ctgtgccttc 1637

agacagagtg gaggggagga ggggcccaag cttatttggt gaaaataaag ggaaaggatga 1697

ggctgcacac acctgaaaca tcttacctag gatgttgcaa gtcaccacag tcaagaagaa 1757

gcgggaatct cgtagatcaa tttctattc atttctgcaa atttattgga ttagtgtgat 1817

tattcagata gtcaaaacag aagcccacgc cttataatat acctatctgc aacatgtact 1877

gggagaaatg aatttaagaa attcacatta aaaaaaaaaag aaggaaacac 1927

<210> 6

<211> 3898

<212> DNA

<213> Mus musculus

20/51

<220>

<221> CDS

<222> (86)..(3244)

<400> 6

cacagcctcc ggctgtccag agtgactgct cccaggaaga ccagtcacac tcccccttgg 60

ccttggtgca ccaggccccg ctggg atg aga agc tgc cgg aga ctg gat cag 112

Met Arg Ser Cys Arg Arg Leu Asp Gln

1

5

ctt cag gcc ggc ctc tgc ctg ctc ctg gcc tcc ctg cag ctc gtg tcc 160

Leu Gln Ala Gly Leu Cys Leu Leu Leu Ala Ser Leu Gln Leu Val Ser

10

15

20

25

tgg acg ctg gct gca gaa cct gtg gac gta ctg gaa gcc tgg ggt gtg 208

Trp Thr Leu Ala Ala Glu Pro Val Asp Val Leu Glu Ala Trp Gly Val

30

35

40

cat aga gac cag gct ggg gtg gct gaa ggg cct ggc ttc tgc ccc ctg 256

His Arg Asp Gln Ala Gly Val Ala Glu Gly Pro Gly Phe Cys Pro Leu

45

50

55

agg att cca cag ggt gac cga gca ttc agg gtg ggc aag tcc agc ctt 304

Arg Ile Pro Gln Gly Asp Arg Ala Phe Arg Val Gly Lys Ser Ser Leu

60

65

70

2 1 / 5 1

ctc agt gtc ccc acg tgg cag ctc ttc cca gat ggg cat ttt cct gag 352

Leu Ser Val Pro Thr Trp Gln Leu Phe Pro Asp Gly His Phe Pro Glu

75

80

85

aac ttt tct gtg ctg ctc aca ctg agg gcc cag cca gcc aat cag tct 400

Asn Phe Ser Val Leu Leu Thr Leu Arg Ala Gln Pro Ala Asn Gln Ser

90

95

100

105

gtc ctt ctg tct att tat gat gag aag ggt gtc cgg cag ctg ggg ctg 448

Val Leu Leu Ser Ile Tyr Asp Glu Lys Gly Val Arg Gln Leu Gly Leu

110

115

120

gca ctg ggg cca gct ctg ggc ctc ctt ggt gac tcc ttc agg ccc ctc 496

Ala Leu Gly Pro Ala Leu Gly Leu Leu Gly Asp Ser Phe Arg Pro Leu

125

130

135

ccc aag caa gtc aac att atg gat ggc agg tgg cac cgt gtg gca gtc 544

Pro Lys Gln Val Asn Ile Met Asp Gly Arg Trp His Arg Val Ala Val

140

145

150

agc atc agt ggt aac aag gtg acc ctg gtg gtt gac tgt gaa ccg cag 592

Ser Ile Ser Gly Asn Lys Val Thr Leu Val Val Asp Cys Glu Pro Gln

155

160

165

ccc cca aca ttt ggt cag ggg cct cgg ttt ata agt aca gct gga ctc 640

2 2 / 5 1

Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Pro Arg Phe Ile Ser Thr Ala Gly Leu

170

175

180

185

act gtg atg gga acc cag gac acc agg gaa gag tct ttt gag gga gac 688

Thr Val Met Gly Thr Gln Asp Thr Arg Glu Glu Ser Phe Glu Gly Asp

190

195

200

atc cag gag ctg ctg tta att cca gac cct cag gct gcc ttc cag gcc 736

Ile Gln Glu Leu Leu Leu Ile Pro Asp Pro Gln Ala Ala Phe Gln Ala

205

210

215

tgt gag agc tac ctc cct ggt tgt gaa acc ctc gat tcc aca acc aca 784

Cys Glu Ser Tyr Leu Pro Gly Cys Glu Thr Leu Asp Ser Thr Thr Thr

220

225

230

ggg gcc ccc aaa gac gat gaa cca gaa acc cct gcc cct cgt cgt cga 832

Gly Ala Pro Lys Asp Asp Glu Pro Glu Thr Pro Ala Pro Arg Arg Arg

235

240

245

aag ggc aaa ggg aag aaa aaa ggg cgg ggt cga aag ggc aag gga aga 880

Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys Gly Arg Gly Arg Lys Gly Lys Gly Arg

250

255

260

265

aag aaa aac aag gag acc tca gag ctg agt ccg acc cct ggt gcc cct 928

Lys Lys Asn Lys Glu Thr Ser Glu Leu Ser Pro Thr Pro Gly Ala Pro

270

275

280

23/51

gag aac cag acc tcc ctc cac atc cct gag aca gag aag aca gtt ccc 976
 Glu Asn Gln Thr Ser Leu His Ile Pro Glu Thr Glu Lys Thr Val Pro
 285 290 295

cac ctg cct ccg act ccc aca cct ctg gcc atc acc acc act gtt aca 1024
 His Leu Pro Pro Thr Pro Thr Pro Leu Ala Ile Thr Thr Thr Val Thr
 300 305 310

att gga caa aat gcc acg gtc tcg aag ggg ttg gac tcc ggt act gaa 1072
 Ile Gly Gln Asn Ala Thr Val Ser Lys Gly Leu Asp Ser Gly Thr Glu
 315 320 325

act gag cag agg act cca gag atg gac gct act gag gag ggt gaa gga 1120
 Thr Glu Gln Arg Thr Pro Glu Met Asp Ala Thr Glu Glu Gly Glu Gly
 330 335 340 345

ggt ggc ccc acc atg ggc ccc aag ttc cgg gca gca gag cag tcc tta 1168
 Gly Gly Pro Thr Met Gly Pro Lys Phe Arg Ala Ala Glu Gln Ser Leu
 350 355 360

cag act gag ttc cag atc ttt cct ggt gct gga gaa aag gga gcg aaa 1216
 Gln Thr Glu Phe Gln Ile Phe Pro Gly Ala Gly Glu Lys Gly Ala Lys
 365 370 375

gga gag cct gcg aca gta gag cag gga cag cag ttt gag ggg cct gca 1264

24/51

Gly Glu Pro Ala Thr Val Glu Gln Gly Gln Gln Phe Glu Gly Pro Ala

380

385

390

gga gct cca gga ccc cgg gga ata tct ggt cct tca ggc cct cct ggg 1312

Gly Ala Pro Gly Pro Arg Gly Ile Ser Gly Pro Ser Gly Pro Pro Gly

395

400

405

cct ccg ggc ttc cct ggg gac cgt ggt cta ccg ggt cct gcc ggc ctc 1360

Pro Pro Gly Phe Pro Gly Asp Arg Gly Leu Pro Gly Pro Ala Gly Leu

410

415

420

425

cca gga atc cca ggc atc gat gga gcc cgg ggc ctg ccg ggc aca gtg 1408

Pro Gly Ile Pro Gly Ile Asp Gly Ala Arg Gly Leu Pro Gly Thr Val

430

435

440

att atg atg ccg ttc cat ttt gca agc agc tcg atg aag gga ccc cca 1456

Ile Met Met Pro Phe His Phe Ala Ser Ser Ser Met Lys Gly Pro Pro

445

450

455

gtg tcc ttc cag cag gcc cag gcc cag gca gta ttg caa cag gct cag 1504

Val Ser Phe Gln Gln Ala Gln Ala Gln Ala Val Leu Gln Gln Ala Gln

460

465

470

ctg tcc atg aaa ggg ccc cct ggt cca gta ggg ctc act ggg cgc cca 1552

Leu Ser Met Lys Gly Pro Pro Gly Pro Val Gly Leu Thr Gly Arg Pro

475

480

485

25 / 51

ggc cct gtg ggc ctc cct gga tat cca ggt ctg aaa ggt gaa ctg gga 1600
 Gly Pro Val Gly Leu Pro Gly Tyr Pro Gly Leu Lys Gly Glu Leu Gly
 490 495 500 505

gaa gtg ggg cca cag ggc ccc cga gga tta cag ggc cct cct ggg cct 1648
 Glu Val Gly Pro Gln Gly Pro Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Pro
 510 515 520

cct gga cgg gaa ggc aag aca ggc cga gct gga gca gat ggg gct cgg 1696
 Pro Gly Arg Glu Gly Lys Thr Gly Arg Ala Gly Ala Asp Gly Ala Arg
 525 530 535

ggg ctc ccg gga gac aca gga cct aag ggt gac agg ggc ttt gat ggc 1744
 Gly Leu Pro Gly Asp Thr Gly Pro Lys Gly Asp Arg Gly Phe Asp Gly
 540 545 550

ctg ccc ggg ctg cct ggt gag aag ggc caa agg ggt gac ttt gga cga 1792
 Leu Pro Gly Leu Pro Gly Glu Lys Gly Gln Arg Gly Asp Phe Gly Arg
 555 560 565

gta ggg caa cct ggt ccc cca gga gag gat ggt gta aag ggc ctg cag 1840
 Val Gly Gln Pro Gly Pro Pro Gly Glu Asp Gly Val Lys Gly Leu Gln
 570 575 580 585

gga cct cca ggg ccc act ggc cag gct ggg gag ccg ggt ccc cga ggt 1888

26/51

Gly Pro Pro Gly Pro Thr Gly Gln Ala Gly Glu Pro Gly Pro Arg Gly

590

595

600

ctg att ggc ccc aga ggt ctc cca ggt ccc cta gga cgc ccg ggt gtg 1936

Leu Ile Gly Pro Arg Gly Leu Pro Gly Pro Leu Gly Arg Pro Gly Val

605

610

615

aca ggg agt gat ggc gca cca ggg gcc aaa ggc aac gtg ggt cct cct 1984

Thr Gly Ser Asp Gly Ala Pro Gly Ala Lys Gly Asn Val Gly Pro Pro

620

625

630

gga gaa cca gga ccc cca gga cag caa gga aac cac ggc tcc cag gga 2032

Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly Gln Gln Gly Asn His Gly Ser Gln Gly

635

640

645

att cca ggc ccc cag ggg ccc att ggc act ccc ggg gaa aag ggt ccc 2080

Ile Pro Gly Pro Gln Gly Pro Ile Gly Thr Pro Gly Glu Lys Gly Pro

650

655

660

665

cct gga aac ccc gga att cca ggt gtc cca gga tct gag ggc ccc ccg 2128

Pro Gly Asn Pro Gly Ile Pro Gly Val Pro Gly Ser Glu Gly Pro Pro

670

675

680

ggc cac cca ggc cac gag ggt ccc aca gga gaa aaa ggg gct cag ggc 2176

Gly His Pro Gly His Glu Gly Pro Thr Gly Glu Lys Gly Ala Gln Gly

685

690

695

27/51

cca cca gga tca gca ggc cct cgg ggc tat cct gga ctt cgt ggt gtg 2224
Pro Pro Gly Ser Ala Gly Pro Arg Gly Tyr Pro Gly Leu Arg Gly Val
700 705 710

aag ggt acc tct ggt aac cgg ggt ctc caa ggc gag aaa gga gaa agg 2272
Lys Gly Thr Ser Gly Asn Arg Gly Leu Gln Gly Glu Lys Gly Glu Arg
715 720 725

gga gag gat ggc ttt cct ggc ttc aag ggt gat gag gga cca aaa ggc 2320
Gly Glu Asp Gly Phe Pro Gly Phe Lys Gly Asp Glu Gly Pro Lys Gly
730 735 740 745

gac cgg gga aac ccc gga ccc cca ggt ccc aga gga gag gat ggt cca 2368
Asp Arg Gly Asn Pro Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Glu Asp Gly Pro
750 755 760

gaa gga caa aag ggg cct ggg gga ctg cct ggt gat gag ggt cct cca 2416
Glu Gly Gln Lys Gly Pro Gly Gly Leu Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro
765 770 775

gga gca gca ggg gag aag ggc aag ctt ggg gtg cca ggt ctc cca ggt 2464
Gly Ala Ala Gly Glu Lys Gly Lys Leu Gly Val Pro Gly Leu Pro Gly
780 785 790

tat cca gga cgc cca gga cct aag gga tct att gga ttt cct gga ccc 2512

28/51

Tyr Pro Gly Arg Pro Gly Pro Lys Gly Ser Ile Gly Phe Pro Gly Pro

795

800

805

ttg gga cca ctg ggg gag aaa ggc aag cgg ggc aaa gca gga cag cca 2560

Leu Gly Pro Leu Gly Glu Lys Gly Lys Arg Gly Lys Ala Gly Gln Pro

810

815

820

825

gga gag gaa gga gaa cgc ggc aca ccg ggc acc cga gga gac agg gga 2608

Gly Glu Glu Gly Glu Arg Gly Thr Pro Gly Thr Arg Gly Asp Arg Gly

830

835

840

cag ccg ggg gcc aca ggc cag cct ggc ccc aag ggt gac gtg ggc cag 2656

Gln Pro Gly Ala Thr Gly Gln Pro Gly Pro Lys Gly Asp Val Gly Gln

845

850

855

aat ggg tct cct ggg ccc cct gga gaa aag ggt cta ccc ggt ctt caa 2704

Asn Gly Ser Pro Gly Pro Pro Gly Glu Lys Gly Leu Pro Gly Leu Gln

860

865

870

ggc cca cca gga ttc ccc gga cca aaa ggc ccc ccg ggt cct cag ggc 2752

Gly Pro Pro Gly Phe Pro Gly Pro Lys Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly

875

880

885

aaa gat ggg ata tct ggg cac cct gga caa aga gga gaa ttg ggc ttc 2800

Lys Asp Gly Ile Ser Gly His Pro Gly Gln Arg Gly Glu Leu Gly Phe

890

895

900

905

29/51

caa ggt ctg aca ggc ccc cct gga cca gct ggc gtc ctt ggt cct cag 2848

Gln Gly Leu Thr Gly Pro Pro Gly Pro Ala Gly Val Leu Gly Pro Gln

910

915

920

gga aag gta ggg gac gtg ggg cct cta ggc gag aga ggc ccc cca ggg 2896

Gly Lys Val Gly Asp Val Gly Pro Leu Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly

925

930

935

cct cct gga cct cct ggt gaa caa ggt ctg cca ggc ata gaa ggc aga 2944

Pro Pro Gly Pro Pro Gly Glu Gln Gly Leu Pro Gly Ile Glu Gly Arg

940

945

950

gaa ggg gcc aag ggt gag cta gga ccc ctg ggg tcc gtc ggg aag gag 2992

Glu Gly Ala Lys Gly Glu Leu Gly Pro Leu Gly Ser Val Gly Lys Glu

955

960

965

ggg cca cct ggg ccc agg ggc ttc cct ggc ccc caa gga gcc ccc gga 3040

Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly Phe Pro Gly Pro Gln Gly Ala Pro Gly

970

975

980

985

gac cca gga ccc att ggt ttg aag ggt gac aaa ggt ccc cca ggc cct 3088

Asp Pro Gly Pro Ile Gly Leu Lys Gly Asp Lys Gly Pro Pro Gly Pro

990

995

1000

gtt ggg gca aat ggc tcc ccg gga gag cgt ggt cct gta ggc ccc tct 3136

30/51

Val Gly Ala Asn Gly Ser Pro Gly Glu Arg Gly Pro Val Gly Pro Ser

1005

1010

1015

ggc att ggc ctt cct ggc cag agt gga ggc caa ggc cct att ggt 3184

Gly Gly Ile Gly Leu Pro Gly Gln Ser Gly Gly Gln Gly Pro Ile Gly

1020

1025

1030

cct gct ggc gag aag ggc tcc ccg gta agt gtc tgt tgg ttg act ttt 3232

Pro Ala Gly Glu Lys Gly Ser Pro Val Ser Val Cys Trp Leu Thr Phe

1035

1040

1045

tct ggc gag aca tgaacaaata tcaactcatt ccagataagt aatcagccat 3284

Ser Gly Glu Thr

1050

ttaccaaaga acttctatct ctgtggactg gagaaacgat gactcaagtg ggtaagagca 3344

catactgctt ttgttgagta cctgagatca gttccagca tccacatggg taggttcaca 3404

tctgcctgta atttccagct ccaggtaatc tgtcatcctc ttctggcctt catgggcaat 3464

tgcactcatg tgcacatata cactcattca catacatata tatataatta aaatttaaaa 3524

aatcaattct taaaattacc tttcccaagt ccagcttaat caagctgtga gtttattggg 3584

attacttaca ggagtatggg tgaggagtga cttataaaac aaggctgact ccagacagct 3644

3 1 / 5 1

gcatactga atggccatct gacctggct catggctcag aagagcggca tccctggagc 3704

tctctataca acttgacgtc agcttgaaag gccaaagact ctcttcctca tagttgtgaa 3764

ctactttctat agcttttagaa tggctgggtga atcctgtaag tttcaggaac tttctaagac 3824

ttgtgagctg tttatatacct gacccctaag gagctttctt caggatggat agtctcaatt 3884

ttaaagaaac tgcc 3898

<210> 7

<211> 522

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 7

ccctgtgcaa gtgccctctg tggtttctct gtgaagagtc tctatgagag aattactggg 60

cgagatggcc attttaagga agacccttac tgggagaaca tgctcaatca ctctgtccac 120

aggaggcttc tgcacagact tggagcagtt cgctacctga tgaatatccc agggaaagct 180

ggccaggact tgctccttgt gacctctgag gcctgcgtgt tgctggatgg acaggatctg 240

gagcccaggt ggacccttgg tgaagttcag gttctgagaa aacctatacct tggccactac 300

aaacctgaca ccttggctgt ggtcattgag aatggaacca gcattgatag acagatacta 360

cttctggacc tcagtactgg gtctatacctg tggagccagc cctcccaag cctgcctggg 420

ggccccacat ccacaagcct gatgactgca gacccccgct cagccttctt cttctggggc 480

3 2 / 5 1

ctccatgac ttgtgagcac taatgagatg gatccccttt cc

522

<210> 8

<211> 442

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Glu Leu Leu Ser Arg Val Leu Leu Trp Lys Leu Leu Leu Leu Gln

1

5

10

15

Ser Ser Ala Val Leu Ser Ser Gly Pro Ser Gly Thr Ala Ala Ala Ser

20

25

30

Asn Ser Leu Val Ser Glu Ser Val Val Ser Leu Ala Ala Gly Thr Gln

35

40

45

Ala Val Leu Arg Cys Gln Ser Pro Arg Met Val Trp Thr Gln Asp Arg

50

55

60

Leu His Asp Arg Gln Arg Val Val His Trp Asp Leu Ser Gly Gly Pro

65

70

75

80

Gly Ser Gln Arg Arg Arg Leu Val Asp Met Tyr Ser Ala Gly Glu Gln

85

90

95

33/51

Arg Val Tyr Glu Pro Arg Asp Arg Asp Arg Leu Leu Leu Ser Pro Ser

100

105

110

Ala Phe His Asp Gly Asn Phe Ser Leu Leu Ile Arg Ala Val Glu Arg

115

120

125

Gly Asp Glu Gly Val Tyr Thr Cys Asn Leu His His His Tyr Cys His

130

135

140

Leu Asp Glu Ser Leu Ala Val Arg Leu Glu Val Thr Glu Asp Pro Leu

145

150

155

160

Leu Ser Arg Ala Tyr Trp Asp Gly Glu Lys Glu Val Leu Val Val Ala

165

170

175

His Gly Ala Pro Ala Leu Met Thr Cys Ile Asn Arg Ala His Val Trp

180

185

190

Thr Asp Arg His Leu Glu Glu Ala Gln Gln Val Val His Trp Asp Arg

195

200

205

Gln Leu Pro Gly Val Ser His Asp Arg Ala Asp Arg Leu Leu Asp Leu

210

215

220

Tyr Ala Ser Gly Glu Arg Arg Ala Tyr Gly Pro Pro Phe Leu Arg Asp

3 4 / 5 1

225	230	235	240
Arg Val Ser Val Asn Thr Asn Ala Phe Ala Arg Gly Asp Phe Ser Leu			
245	250	255	
Arg Ile Asp Glu Leu Glu Arg Ala Asp Glu Gly Ile Tyr Ser Cys His			
260	265	270	
Leu His His His Tyr Cys Gly Leu His Glu Arg Arg Val Phe His Leu			
275	280	285	
Gln Val Thr Glu Pro Ala Phe Glu Pro Pro Ala Arg Ala Ser Pro Gly			
290	295	300	
Asn Gly Ser Gly His Ser Ser Ala Pro Ser Pro Asp Pro Thr Leu Thr			
305	310	315	320
Arg Gly His Ser Ile Ile Asn Val Ile Val Pro Glu Asp His Thr His			
325	330	335	
Phe Phe Gln Gln Leu Gly Tyr Val Leu Ala Thr Leu Leu Leu Phe Ile			
340	345	350	
Leu Leu Leu Ile Thr Val Val Leu Ala Thr Arg His Arg His Ser Gly			
355	360	365	

3 5 / 5 1

Gly Cys Lys Thr Ser Asp Lys Lys Ala Gly Lys Ser Lys Gly Lys Asp

370

375

380

Val Asn Met Val Glu Phe Ala Val Ala Thr Arg Asp Gln Ala Pro Tyr

385

390

395

400

Arg Thr Glu Asp Ile Gln Leu Asp Tyr Lys Asn Asn Ile Leu Lys Glu

405

410

415

Arg Ala Glu Leu Ala His Ser Pro Leu Pro Ala Lys Asp Val Asp Leu

420

425

430

Asp Lys Glu Phe Arg Lys Glu Tyr Cys Lys

435

440

<210> 9

<211> 483

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Met Lys Ala Phe Tyr Ala Phe Cys Val Val Leu Leu Val Phe Gly Ser

1

5

10

15

Val Ser Glu Ala Lys Phe Asp Asp Phe Glu Asp Glu Glu Asp Ile Val

3 6 / 5 1

20

25

30

Glu Tyr Asp Asp Asn Asp Phe Ala Glu Phe Glu Asp Val Met Glu Asp

35

40

45

Ser Val Thr Glu Ser Pro Gln Arg Val Ile Ser Thr Glu Asp Asp Glu

50

55

60

Asp Glu Ala Thr Val Glu Leu Glu Gly Gln Asp Glu Ser Gln Glu Gly

65

70

75

80

Asp Phe Glu Asp Ala Asp Thr Gln Glu Gly Asp Thr Glu Ser Glu Pro

85

90

95

Tyr Asp Asp Glu Glu Phe Glu Gly Tyr Glu Asp Lys Pro Asp Thr Ser

100

105

110

Ser Asn Lys Asn Lys Asp Pro Ile Thr Ile Val Asp Val Pro Ala His

115

120

125

Leu Gln Asn Ser Trp Glu Ser Tyr Tyr Leu Glu Ile Leu Met Val Thr

130

135

140

Gly Leu Leu Ala Tyr Ile Met Asn Tyr Ile Ile Gly Lys Asn Lys Asn

145

150

155

160

37/51

Ser Arg Leu Ala Gln Ala Trp Phe Asn Ser His Arg Glu Leu Leu Glu

165

170

175

Ser Asn Phe Thr Leu Val Gly Asp Asp Gly Thr Asn Lys Glu Ala Thr

180

185

190

Ser Thr Gly Lys Leu Asn Gln Glu Asn Glu His Ile Tyr Asn Leu Trp

195

200

205

Cys Ser Gly Arg Val Cys Cys Glu Gly Met Leu Ile Gln Leu Arg Phe

210

215

220

Leu Lys Arg Gln Asp Leu Leu Asn Val Leu Ala Arg Met Met Arg Pro

225

230

235

240

Val Ser Asp Gln Val Gln Ile Lys Val Thr Met Asn Asp Glu Asp Met

245

250

255

Asp Thr Tyr Val Phe Ala Val Gly Thr Arg Lys Ala Leu Leu Arg Leu

260

265

270

Gln Lys Glu Met Gln Asp Leu Ser Glu Phe Cys Ser Asp Lys Pro Lys

275

280

285

Ser Gly Ala Lys Tyr Gly Leu Pro Asp Ser Leu Ala Ile Leu Ser Glu

290

295

300

38/51

Met Gly Glu Val Thr Glu Gly Met Met Asp Thr Lys Met Val His Phe
305 310 315 320

Leu Thr His Tyr Ala Asp Lys Ile Glu Ser Val His Phe Ser Asp Gln
325 330 335

Phe Ser Gly Pro Lys Ile Met Gln Glu Glu Gly Gln Pro Leu Lys Leu
340 345 350

Pro Asp Thr Lys Arg Thr Leu Leu Phe Thr Phe Asn Val Pro Gly Ser
355 360 365

Gly Asn Thr Tyr Pro Lys Asp Met Glu Ser Leu Leu Pro Leu Met Asn
370 375 380

Met Val Ile Tyr Ser Ile Asp Lys Ala Lys Lys Phe Arg Leu Asn Arg
385 390 395 400

Glu Gly Lys Gln Lys Ala Asp Lys Asn Arg Ala Arg Val Glu Glu Asn
405 410 415

Phe Leu Lys Leu Thr His Val Gln Arg Gln Glu Ala Ala Gln Ser Arg
420 425 430

Arg Glu Glu Lys Lys Arg Ala Glu Lys Glu Arg Ile Met Asn Glu Glu

39/51

435

440

445

Asp Pro Glu Lys Gln Arg Arg Leu Glu Glu Ala Ala Leu Arg Arg Glu

450

455

460

Gln Lys Lys Leu Glu Lys Lys Gln Met Lys Met Lys Gln Ile Lys Val

465

470

475

480

Lys Ala Met

<210> 10

<211> 373

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Met Ser Leu Phe Phe Leu Trp Leu Val Ser Tyr Tyr Val Gly Thr Leu

1

5

10

15

Gly Thr His Thr Glu Ile Lys Arg Val Ala Glu Glu Lys Val Thr Leu

20

25

30

Pro Cys His His Gln Leu Gly Leu Pro Glu Lys Asp Thr Leu Asp Ile

35

40

45

40/51

Glu Trp Leu Leu Thr Asp Asn Glu Gly Asn Gln Lys Val Val Ile Thr

50

55

60

Tyr Ser Ser Arg His Val Tyr Asn Asn Leu Thr Glu Glu Gln Lys Gly

65

70

75

80

Arg Val Ala Phe Ala Ser Asn Phe Leu Ala Gly Asp Ala Ser Leu Gln

85

90

95

Ile Glu Pro Leu Lys Pro Ser Asp Glu Gly Arg Tyr Thr Cys Lys Val

100

105

110

Lys Asn Ser Gly Arg Tyr Val Trp Ser His Val Ile Leu Lys Ala Leu

115

120

125

Val Arg Pro Ser Lys Pro Lys Cys Glu Leu Glu Gly Glu Pro Thr Glu

130

135

140

Gly Ser Asp Leu Thr Leu Gln Cys Glu Ser Ala Ser Gly Thr Lys Pro

145

150

155

160

Ile Val Tyr Tyr Trp Gln Arg Ile Arg Glu Lys Glu Gly Glu Asp Glu

165

170

175

His Leu Pro Pro Lys Ser Arg Ile Asp Tyr Asn Asn Pro Gly Arg Val

180

185

190

41 / 51

Leu Leu Gln Asn Leu Thr Met Ala Ser Ser Gly Leu Tyr Gln Cys Thr

195

200

205

Ala Gly Asn Glu Ala Gly Lys Glu Ser Cys Val Val Arg Val Thr Val

210

215

220

Gln Tyr Val Gln Ser Ile Gly Met Val Ala Gly Ala Val Thr Gly Ile

225

230

235

240

Val Ala Gly Ala Leu Leu Ile Phe Leu Leu Ile Trp Leu Leu Ile Arg

245

250

255

Arg Lys Ser Lys Asp Arg Tyr Glu Glu Glu Asp Arg Pro Asn Glu Ile

260

265

270

Arg Glu Asp Ala Glu Ala Pro Arg Ala Arg Leu Val Lys Pro Ser Ser

275

280

285

Ser Ser Ser Gly Ser Arg Ser Ser Arg Ser Gly Ser Ser Ser Thr Arg

290

295

300

Ser Thr Gly Asn Ser Ala Ser Arg Ser Gln Arg Thr Leu Ser Ser Glu

305

310

315

320

Ala Ala Pro Gln Gln Pro Gly Leu Ala Pro Gln Ala Tyr Ser Leu Ile

4 2 / 5 1

325

330

335

Gly Pro Glu Val Arg Gly Ser Glu Pro Lys Lys Val His His Thr Thr

340

345

350

Leu Thr Lys Ala Glu Thr Thr Leu Ser Thr Thr Pro Ser Gln Ser Lys

355

360

365

Ala Phe Gln Thr Val

370

<210> 11

<211> 1053

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Met Arg Ser Cys Arg Arg Leu Asp Gln Leu Gln Ala Gly Leu Cys Leu

1

5

10

15

Leu Leu Ala Ser Leu Gln Leu Val Ser Trp Thr Leu Ala Ala Glu Pro

20

25

30

Val Asp Val Leu Glu Ala Trp Gly Val His Arg Asp Gln Ala Gly Val

35

40

45

43/51

Ala Glu Gly Pro Gly Phe Cys Pro Leu Arg Ile Pro Gln Gly Asp Arg
50 55 60

Ala Phe Arg Val Gly Lys Ser Ser Leu Leu Ser Val Pro Thr Trp Gln
65 70 75 80

Leu Phe Pro Asp Gly His Phe Pro Glu Asn Phe Ser Val Leu Leu Thr
85 90 95

Leu Arg Ala Gln Pro Ala Asn Gln Ser Val Leu Leu Ser Ile Tyr Asp
100 105 110

Glu Lys Gly Val Arg Gln Leu Gly Leu Ala Leu Gly Pro Ala Leu Gly
115 120 125

Leu Leu Gly Asp Ser Phe Arg Pro Leu Pro Lys Gln Val Asn Ile Met
130 135 140

Asp Gly Arg Trp His Arg Val Ala Val Ser Ile Ser Gly Asn Lys Val
145 150 155 160

Thr Leu Val Val Asp Cys Glu Pro Gln Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly
165 170 175

Pro Arg Phe Ile Ser Thr Ala Gly Leu Thr Val Met Gly Thr Gln Asp

4 4 / 5 1

180

185

190

Thr Arg Glu Glu Ser Phe Glu Gly Asp Ile Gln Glu Leu Leu Leu Ile

195

200

205

Pro Asp Pro Gln Ala Ala Phe Gln Ala Cys Glu Ser Tyr Leu Pro Gly

210

215

220

Cys Glu Thr Leu Asp Ser Thr Thr Thr Gly Ala Pro Lys Asp Asp Glu

225

230

235

240

Pro Glu Thr Pro Ala Pro Arg Arg Arg Lys Gly Lys Gly Lys Lys Lys

245

250

255

Gly Arg Gly Arg Lys Gly Lys Gly Arg Lys Lys Asn Lys Glu Thr Ser

260

265

270

Glu Leu Ser Pro Thr Pro Gly Ala Pro Glu Asn Gln Thr Ser Leu His

275

280

285

Ile Pro Glu Thr Glu Lys Thr Val Pro His Leu Pro Pro Thr Pro Thr

290

295

300

Pro Leu Ala Ile Thr Thr Thr Val Thr Ile Gly Gln Asn Ala Thr Val

305

310

315

320

4 5 / 5 1

Ser Lys Gly Leu Asp Ser Gly Thr Glu Thr Glu Gln Arg Thr Pro Glu

325

330

335

Met Asp Ala Thr Glu Glu Gly Glu Gly Gly Gly Pro Thr Met Gly Pro

340

345

350

Lys Phe Arg Ala Ala Glu Gln Ser Leu Gln Thr Glu Phe Gln Ile Phe

355

360

365

Pro Gly Ala Gly Glu Lys Gly Ala Lys Gly Glu Pro Ala Thr Val Glu

370

375

380

Gln Gly Gln Gln Phe Glu Gly Pro Ala Gly Ala Pro Gly Pro Arg Gly

385

390

395

400

Ile Ser Gly Pro Ser Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Phe Pro Gly Asp

405

410

415

Arg Gly Leu Pro Gly Pro Ala Gly Leu Pro Gly Ile Pro Gly Ile Asp

420

425

430

Gly Ala Arg Gly Leu Pro Gly Thr Val Ile Met Met Pro Phe His Phe

435

440

445

Ala Ser Ser Ser Met Lys Gly Pro Pro Val Ser Phe Gln Gln Ala Gln

450

455

460

46 / 51

Ala Gln Ala Val Leu Gln Gln Ala Gln Leu Ser Met Lys Gly Pro Pro

465

470

475

480

Gly Pro Val Gly Leu Thr Gly Arg Pro Gly Pro Val Gly Leu Pro Gly

485

490

495

Tyr Pro Gly Leu Lys Gly Glu Leu Gly Glu Val Gly Pro Gln Gly Pro

500

505

510

Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Arg Glu Gly Lys Thr

515

520

525

Gly Arg Ala Gly Ala Asp Gly Ala Arg Gly Leu Pro Gly Asp Thr Gly

530

535

540

Pro Lys Gly Asp Arg Gly Phe Asp Gly Leu Pro Gly Leu Pro Gly Glu

545

550

555

560

Lys Gly Gln Arg Gly Asp Phe Gly Arg Val Gly Gln Pro Gly Pro Pro

565

570

575

Gly Glu Asp Gly Val Lys Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Pro Thr Gly

580

585

590

Gln Ala Gly Glu Pro Gly Pro Arg Gly Leu Ile Gly Pro Arg Gly Leu

47/51

595

600

605

Pro Gly Pro Leu Gly Arg Pro Gly Val Thr Gly Ser Asp Gly Ala Pro

610

615

620

Gly Ala Lys Gly Asn Val Gly Pro Pro Gly Glu Pro Gly Pro Pro Gly

625

630

635

640

Gln Gln Gly Asn His Gly Ser Gln Gly Ile Pro Gly Pro Gln Gly Pro

645

650

655

Ile Gly Thr Pro Gly Glu Lys Gly Pro Pro Gly Asn Pro Gly Ile Pro

660

665

670

Gly Val Pro Gly Ser Glu Gly Pro Pro Gly His Pro Gly His Glu Gly

675

680

685

Pro Thr Gly Glu Lys Gly Ala Gln Gly Pro Pro Gly Ser Ala Gly Pro

690

695

700

Arg Gly Tyr Pro Gly Leu Arg Gly Val Lys Gly Thr Ser Gly Asn Arg

705

710

715

720

Gly Leu Gln Gly Glu Lys Gly Glu Arg Gly Glu Asp Gly Phe Pro Gly

725

730

735

48/51

Phe Lys Gly Asp Glu Gly Pro Lys Gly Asp Arg Gly Asn Pro Gly Pro

740

745

750

Pro Gly Pro Arg Gly Glu Asp Gly Pro Glu Gly Gln Lys Gly Pro Gly

755

760

765

Gly Leu Pro Gly Asp Glu Gly Pro Pro Gly Ala Ala Gly Glu Lys Gly

770

775

780

Lys Leu Gly Val Pro Gly Leu Pro Gly Tyr Pro Gly Arg Pro Gly Pro

785

790

795

800

Lys Gly Ser Ile Gly Phe Pro Gly Pro Leu Gly Pro Leu Gly Glu Lys

805

810

815

Gly Lys Arg Gly Lys Ala Gly Gln Pro Gly Glu Glu Gly Glu Arg Gly

820

825

830

Thr Pro Gly Thr Arg Gly Asp Arg Gly Gln Pro Gly Ala Thr Gly Gln

835

840

845

Pro Gly Pro Lys Gly Asp Val Gly Gln Asn Gly Ser Pro Gly Pro Pro

850

855

860

Gly Glu Lys Gly Leu Pro Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Phe Pro Gly

865

870

875

880

49 / 51

Pro Lys Gly Pro Pro Gly Pro Gln Gly Lys Asp Gly Ile Ser Gly His

885

890

895

Pro Gly Gln Arg Gly Glu Leu Gly Phe Gln Gly Leu Thr Gly Pro Pro

900

905

910

Gly Pro Ala Gly Val Leu Gly Pro Gln Gly Lys Val Gly Asp Val Gly

915

920

925

Pro Leu Gly Glu Arg Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Pro Pro Gly Glu

930

935

940

Gln Gly Leu Pro Gly Ile Glu Gly Arg Glu Gly Ala Lys Gly Glu Leu

945

950

955

960

Gly Pro Leu Gly Ser Val Gly Lys Glu Gly Pro Pro Gly Pro Arg Gly

965

970

975

Phe Pro Gly Pro Gln Gly Ala Pro Gly Asp Pro Gly Pro Ile Gly Leu

980

985

990

Lys Gly Asp Lys Gly Pro Pro Gly Pro Val Gly Ala Asn Gly Ser Pro

995

1000

1005

Gly Glu Arg Gly Pro Val Gly Pro Ser Gly Gly Ile Gly Leu Pro Gly

5 0 / 5 1

1010

1015

1020

Gln Ser Gly Gly Gln Gly Pro Ile Gly Pro Ala Gly Glu Lys Gly Ser

1025

1030

1035

1040

Pro Val Ser Val Cys Trp Leu Thr Phe Ser Gly Glu Thr

1045

1050

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 12

gggggtggac catcctcta

19

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

51/51

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 13

cgcgagctg taaacggtg

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01863

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl ⁷ C12N15/11, C12N15/12, C12N5/00, C12N21/02, C07K16/18 C07K14/47, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/15		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbol) Int. Cl ⁷ C12N15/11, C12N15/12, C12N5/00, C12N21/02, C07K16/18 C07K14/47, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/15		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JICST FILE (JOIS), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), MEDLINE (STN), EMBL/DBJ/Genbank/PIR/Swissprot/Geneseq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 00/12708, A2 (Genentech Inc.) 09 March, 2000 (09.03.00), Claims; sequence Nos. 76-77, pages 329, 395-396, 479, 486-488; Figs. 45-46 & AU, 9955908, A & US, 6144037, A	1-9
PX	WO, 00/21986, A2 (Incyte Pharmaceuticals Inc.) 20 April, 2000 (20.04.00), Claims; sequence No. 20 & AU, 9964177, A & EP, 1037915, A1	1-9
PX	WO, 00/53750, A1 (Genentech Inc.), 14 September, 2000 (14.09.00) Claims; sequence Nos. 30-31; pages 15, 85-89; Figs. 21-22 & AU, 200031077, A	1-9
PX	WO, 00/63438, A2 (Curagen Corporation) 26 October, 2000 (26.10.00), Claims; sequence Nos. 3-4; page 68 & AU, 200043663, A	1-9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 June, 2001 (05.06.01)		Date of mailing of the international search report 19 June, 2001 (19.06.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01863

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Parts concerning the clones "#103" (SEQ ID NOS:3 and 8) in claims 1 to 9.

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/01863

Continuation of Box No.II of Continuation of first sheet (1)

DNAs relating to SEQ ID NOS:1 to 7 as set forth in claim 1 have no common chemical structure in common. The only one point common to these DNAs resides in that they encode proteins having signal sequences originating in an adipocyte strain 3T3.

However, document 1 (JP, 8-271, A) discloses a human glial blastoma-origin protein having a 98% homology over the full length with the amino acid sequence of SEQ ID NO:9 according to the invention encoded by the DNA of SEQ ID NO:4 according to the invention which is the protein having a signal sequence originating in the adipocyte strain 3T3 (claims, SEQ ID NOS:1-4).

Document 2 (WO, 98/40483, A2) discloses a protein, which has a 98% homology over the full length with the amino acid sequence of SEQ ID NO:9 according to the invention, as a protein encoded by a gene No:21 and expressed in various tissues (p. 22-23, SEQ ID NOS:31, 71).

Moreover, document 3 (WO, 00/05367, A2) discloses a fibrosarcoma strain-origin protein called HP01462 which has a 98% homology over the full length with the amino acid sequence of SEQ ID NO:9 according to the invention (SEQ ID NOS:121, 131, 141).

As the above documents 1 to 3 show, there have been already obtained from other cell strains proteins which are identical with the proteins originating in the adipocyte strain and having signal sequences. Thus, it cannot be always concluded that a protein has such characteristics as being expressed specifically in an adipocyte cell strain alone, even though the protein is obtained from the adipocyte cell strain.

Therefore, DNAs cannot be specifically characterized by the fact of being obtained from a specific adipocyte strain.

Moreover, it has been publicly known that DNAs encoding secretory proteins or membrane proteins and containing signal peptides are obtained from the adipocyte strain 3T3, as stated in document 4 (J. Biol. Chem., Vol.271[18] (1996) p.10697-107013).

Therefore, the fact of being DNAs encoding proteins having signal sequences originating in the adipocyte strain 3T3 cannot be regarded as a special technical matter as defined in PCT Rule 13.2.

According to PCT Rule 13.3, unity of invention should be judged without considering whether the corresponding inventions are described in separate claims or in a single claim in an alternative form.

Accordingly, the inventions relating to DNAs containing the code regions of the base sequences represented by SEQ ID NOS:1 to 7, among the inventions as set forth in claim 1, are considered not as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept but a group consisting of 7 inventions relating respectively to 7 different proteins.

Such being the case, there is no special technical matter common to all of these claims and it is recognized that the inventions as set forth in claims 1 to 9 involve 7 groups of inventions having all of the inventions relating respectively to the DNAs of SEQ ID NOS:1 to 7 in claims 1 to 9.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO1/01863

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/11, C12N15/12, C12N5/00, C12N21/02, C07K16/18
C07K14/47, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/15

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N15/11, C12N15/12, C12N5/00, C12N21/02, C07K16/18
C07K14/47, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/15

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG),
MEDLINE (STN), EMBL/DDBJ/Genbank/PIR/Swissprot/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 00/12708, A2 (Genentech Inc.) 9. 3月. 2000 (09. 03. 00) 特許請求の範囲, 配列番号76-77, 第329, 395-396, 479, 486-488頁, 図45-46, 参照 &AU, 9955908, A &US, 6144037, A	1-9
PX	WO, 00/21986, A2 (Incyte Pharmaceuticals Inc) 20. 4月. 2000 (20. 04. 00) 特許請求の範囲, 配列表配列番号20, 参照 &AU, 9964177, A &EP, 1037915, A1	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 06. 01

国際調査報告の発送日

19.06.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 肇



4B

9453

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	WO, 00/53750, A1 (Genentech Inc.) 14. 9月. 2000 (14. 09. 00) 特許請求の範囲, 配列番号30-31, 第15, 85-89頁, 図21-22, 参照 &AU, 200031077, A	1-9
PX	WO, 00/63438, A2 (Curagen Corporation) 26. 10. 2000 (26. 10. 00) 特許請求の範囲, 配列番号3-4, 第68頁参照 &AU, 200043663, A	1-9

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

特別ページ参照のこと

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1～9のうち、クローン「#103」(配列番号3及び8)に関する部分

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲1に記載された配列番号1～7に係るDNAは共通の化学構造を有するものでなく、脂肪細胞株3T3に由来しシグナル配列を有するタンパク質をコードすることにおいてのみ共通する。

しかしながら、文献1(JP, 8-271, A)には、脂肪細胞3T3に由来しシグナル配列を有するタンパク質である本願配列番号4に係るDNAによってコードされた本願配列番号9に係るアミノ酸配列と全長に亘り98%の相同性を有するヒトグリア芽細胞腫由来のタンパク質が開示されている(請求の範囲, 配列番号1～4)。

また、文献2(WO, 98/40483, A2)には、本願配列番号9に係るアミノ酸配列と全長に亘り98%の相同性を有するタンパク質が、遺伝子No: 21によってコードされる種々の組織において発現されるタンパク質として開示されている(第22～23頁, 配列番号31, 71)。

また、文献3(WO, 00/05367, A2)には、本願配列番号9に係るアミノ酸配列と全長に亘り98%の相同性を有するHP01462と呼ばれる繊維肉腫細胞株由来のタンパク質が開示されている(配列番号121, 131, 141)。

すなわち、当該文献1～3に記載されているように、脂肪細胞株に由来しシグナル配列を有するタンパク質と同一のタンパク質が他の細胞株からも得られていることから、タンパク質が脂肪細胞株から得られたものであったとしても、脂肪細胞株のみに特異的に発現するなどの特徴を有するものであるとは限らない。

よって、特定の脂肪細胞株から得られたものであることによって、DNAが格別の特徴付けられるとはいえない。

また、そもそも、脂肪細胞株3T3からシグナルペプチドを含む分泌タンパク質または膜タンパク質をコードするDNAを得ることは、文献4(J. Biol. Chem., Vol. 271[18](1996)p. 10697-107013)に記載されているように公知の事項である。

したがって、脂肪細胞株3T3に由来するシグナル配列を有するタンパク質をコードするDNAであることはPCT規則13.2における特別な技術的事項であるとはいえない。

PCT規則13.3によると、発明の単一性の判断はこれらの発明が別個の請求の範囲に記載されているか単一の請求の範囲に択一的な形式によって記載されているかを考慮することなく行われるべきものである。

よって、請求の範囲1に記載された発明のうち配列番号1～7に記載の塩基配列のコード領域を含むDNAに関する発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、異なった7個のタンパク質それぞれに関する7個の発明からなる発明群であると認める。

それ故に、請求の範囲の全てに共通の特別な技術的事項はなく、請求の範囲1～9に係る発明は、請求の範囲1～9のうち配列番号1～7のそれぞれに係るDNAからなる発明群を全て合わせた7個の発明群からなるものであると認める。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.